

Untersuchungen zur Eisenassimilation in Pflanzen

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

"doctor rerum naturalium" (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Ulrich Eckhardt

Präsident der Humboldt-Universität:

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Math.-Nat. Fakultät I:

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas J. Buckhout

Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Prof. Dr. Wolfgang Brüggemann

Datum der Promotion:

19. 12. 2000

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur pflanzlichen Eisenassimilation durchgeführt. Zwei cDNAs aus Tomatenwurzeln (*LeIRT1* und *LeIRT2*, GenBank Acc-Nr. AF176579 und AF176580) wurden isoliert. Sie komplementierten Fe-aufnahmedefiziente Hefestämme in Bezug auf das Wachstum auf Fe-limitierendem Medium. Die durch die LeIRT-Proteine vermittelte Fe-Aufnahme wurde in Hefezellen charakterisiert. Sie war temperaturabhängig, sättigbar und Fe^{2+} , nicht Fe^{3+} wurde transportiert. Kompetitions- und Komplementationsexperimente mit metall-aufnahmedefizienten Hefemutanten legten die Vermutung nahe, daß die beiden cDNAs für Kationentransporter codieren, die eine breite Substratspezifität für Übergangsmetalle aufweisen. Die Transkripte der *LeIRT*-Gene konnten fast ausschließlich in Wurzeln nachgewiesen werden, wobei *LeIRT1* durch Fe-Mangel induziert war, während für *LeIRT2* keine Regulation durch die Fe-Ernährung der Pflanzen erkennbar war. Die Genstruktur wurde aufgeklärt (GenBank Acc-Nr. AF246266).

Schwierigkeiten in der Analyse der Fe-Assimilation höherer Pflanzen machten es notwendig, einen neuen Modellorganismus zu suchen. Dabei wurde die einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* ausgewählt. Physiologische Studien zeigten, daß diese Alge ähnliche Fe-Mangelreaktionen wie die meisten höheren Pflanzen aufweist. Insbesondere die starke Induktion einer Fe^{3+} -Chelatreduktase und die parallele Induktion der Fe-Transportkapazität unter Fe-Mangel waren deutlich. Mindestens zwei Fe-Transportsysteme wurden postuliert, von denen das höher-affine durch Cu-Ionen gehemmt wurde.

Schlagerworte: Fe-Transport, Hefekomplementation, ZIP-Familie, Tomate, *Chlamydomonas*.

Abstract

In the present study, experiments were conducted to analyze the iron assimilation in plants. Two cDNAs from tomato roots (*LeIRT1* and *LeIRT2*, GenBank Acc-Nr. AF176579 and AF176580) were isolated that complemented the growth defect of Fe uptake-deficient yeast mutants. The Fe uptake mediated by the LeIRT proteins was characterized in yeast. It was temperature-dependent, saturable and Fe^{2+} rather than Fe^{3+} was transported. Competition and complementation experiments with metal uptake-deficient yeast mutants suggested that both cDNAs code for cation transporters exhibiting broad substrate specificity for transition metals. The transcripts of both genes were predominantly detected in roots, *LeIRT1* being induced by Fe deficiency whereas *LeIRT2* was unaffected by the Fe status of the plants. The gene structure was determined (GenBank Acc-Nr. AF246266).

Problems in the analysis of Fe assimilation in higher plants made it necessary to establish a new model organism. The unicellular eucaryotic alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, was chosen. Physiological studies indicated that this alga reacted to Fe deficiency similar to most higher plants. Particularly the strong induction of an Fe^{3+} -chelate reductase paralleled by the induction of Fe transport capacity under Fe deficiency were evident. At least two Fe transporters were postulated, one of which was inhibited by Cu ions.

Key words: Fe transport, yeast complementation, ZIP family, tomato, *Chlamydomonas*.

Abkürzungen und Anglizismen

Alignment	=	geordnete Aufstellung mehrerer Sequenzen
Annealing	=	Anlagerung von Oligonukleotiden an ihre komplementäre Sequenz
ATP	=	Adenosintriphosphat
ATPase	=	Adenosintriphosphat- γ -Phosphatase
BAC	=	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCDS	=	Bathocuproin-Disulfonsäure (ein starker Cu^+ -Chelator)
bp	=	Basenpaare
BPDS	=	Bathophenanthrolen-Disulfonsäure (ein starker Fe^{2+} -Chelator)
cDNA	=	zur mRNA komplementäre DNA
Ci	=	Curie (1 Ci = 37 MBq)
<i>C. reinhardtii</i>	=	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
DFOB	=	Desferrioxamin B (ein Pilzsiderophor)
DNA	=	2'-Desoxyribonucleinsäure
DNP	=	2,4-Dinitrophenol
dNTP	=	Desoxynucleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	Ethylendinitrilotetraacetat
EST	=	" <i>expressed sequence tag</i> ", cDNA-Klon mit kurzer Sequenzinformation
Ferricyanid	=	Hexacyanoferrat(III)
FCCP	=	Carbonylcyanid-p-Trifluormethoxy-Phenylhydrazon
GUS	=	β -Glucuronidase
HEDTA	=	N-Hydroxyethyl-Ethylendiamin-NN'-Triacetat
IPTG	=	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
kb	=	Kilobasenpaare
kDa	=	Kilodalton
K_m	=	Michaelis-Konstante
MES	=	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
M_r	=	relatives Molekulargewicht
mRNA	=	Messenger-RNA
<i>Nramp</i>	=	<i>Natural resistance associated macrophage protein</i>
Nt	=	Nukleotide
PCMBS	=	p-Chlormercuriphenylsulfonsäure
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PGK	=	Phosphoglyceratkinase
Primer	=	synthetische Oligonucleotide
primer extension	=	enzymatische Verlängerung eines Oligonucleotides
RNA	=	Ribonucleinsäure
RNase	=	Ribonuclease
ROS	=	reaktive Sauerstoffspezies
RT	=	Reverse Transkriptase
Screen/Screening	=	durchmustern/Durchmusterung
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
TM	=	Transmembran- / transmembranär
<i>upstream</i>	=	stromaufwärts, entgegen der Transkriptionsrichtung
X-Gal	=	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Inhalt:

1	EINLEITUNG	6
1.1	BEDEUTUNG DES EISENS IN DER PFLANZENERNÄHRUNG	7
1.2	EISENASSIMILATION IN PFLANZEN	10
1.2.1	<i>Ansäuerung der Rhizosphäre</i>	11
1.2.2	<i>Eisenreduktion an der Plasmamembran von Wurzelzellen</i>	12
1.2.3	<i>Transport von Fe^{2+} in die Rhizodermis</i>	16
1.2.4	<i>Eisenassimilation einzelliger Algen</i>	17
1.3	EISENASSIMILATION IN HEFE	18
1.3.1	<i>Biochemische und genetische Charakterisierung der Eisenreduktasen in Hefe</i>	18
1.3.2	<i>Molekulare Charakterisierung der Fe-Transporter in Hefe</i>	19
1.4	ANSÄTZE ZUR MOLEKULAREN CHARAKTERISIERUNG DER EISENASSIMILATION IN HÖHEREN PFLANZEN	21
1.4.1	<i>Komplementation von Hefemutanten mit pflanzlichen cDNAs</i>	21
1.4.2	<i>Differentielle Proteinmuster in Wurzeln</i>	21
1.4.3	<i>Molekularbiologische Ansätze zur Identifizierung eisenmangel-induzierter Genprodukte</i>	22
1.5	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	22
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	MATERIAL	23
2.1.1	<i>Pflanzen, Stämme und Vektoren</i>	23
2.1.2	<i>Geräte</i>	24
2.1.3	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	24
2.1.4	<i>Radiochemikalien</i>	24
2.1.5	<i>Synthetische Oligonucleotide</i>	24
2.2	METHODEN	25
2.2.1	<i>Anzucht von Tomatenpflanzen</i>	25
2.2.2	<i>Anzucht der einzelligen Alge Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
2.2.3	<i>Eisenchelat-Reduktasetest in Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
2.2.4	<i>Kupferreduktasetest in Chlamydomonas reinhardtii</i>	25
2.2.5	<i>Messung der Eisenaufnahme in Chlamydomonas reinhardtii</i>	26
2.2.6	<i>RNA-Isolation aus Pflanzen und Northern-Blot-Analyse</i>	26
2.2.7	<i>DNA-Isolation aus Pflanzen und Southern Blot-Analyse</i>	26
2.2.8	<i>PCR-Amplifikation von DNA mit spezifischen Primern</i>	26
2.2.9	<i>RT-PCR</i>	26
2.2.10	<i>Konstruktion von cDNA-Banken</i>	26
2.2.11	<i>Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA</i>	27
2.2.12	<i>Computergestützte Analyse der DNA-Sequenzen</i>	27
2.2.13	<i>Sonstige molekularbiologische Methoden</i>	27
2.2.14	<i>Transformation von Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2.15	<i>Präparation von Plasmid- und genomischer DNA aus Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2.16	<i>Eisenchelat-Reduktasetest in Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2.17	<i>Messung der Eisenaufnahme in Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.2.18	<i>Sonstige hefegenetische Methoden</i>	28
3	ERGEBNISSE	29
3.1	KONZEPT ZUR ISOLIERUNG VON FE-TRANSPORTER-CDNA-KLONEN AUS TOMATEN	29
3.2	KONSTRUKTION NEUER HEFE-EXPRESSIONSVEKTOREN	29
3.3	KONSTRUKTION EINER FE-TRANSPORT-DEFIZIENTEN HEFEMUTANTE	30

3.3.1	<i>Deletion des FTR1-Gens im Hefestamm S288C</i>	30
3.3.2	<i>Wachstum der putativen Δftr1-Mutanten auf eisenlimitiertem Medium</i>	32
3.3.3	<i>Messung der Fe-Transports im Stamm AMY43</i>	32
3.4	KONSTRUKTION EINER TOMATENWURZEL-CDNA-BANK	33
3.5	SCREENING DER TOMATENWURZEL-CDNA-BANK MIT DER IRT1-CDNA AUS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	34
3.6	ISOLIERUNG PUTATIVER FE-TRANSPORTER-CDNAs AUS TOMATENWURZELN	35
3.6.1	<i>Sequenzanalyse der putativen Fe-Transporter-cDNAs aus Tomaten</i>	35
3.6.2	<i>Ähnlichkeiten der LeIRT-Proteine mit bekannten Proteinen</i>	39
3.7	CHARAKTERISIERUNG DER CDNA-KLONE IN HEFE	42
3.7.1	<i>Wachstum einer fet3/fet4-Hefemutante in Abhängigkeit der Tomaten-cDNAs</i>	42
3.7.2	<i>Fe-Aufnahme einer fet3/fet4-Hefemutante in Abhängigkeit der Tomaten-cDNAs</i>	43
3.7.3	<i>Valenz des transportierten Eisens</i>	44
3.7.4	<i>Kinetische Parameter der LeIRT-Proteine</i>	44
3.7.5	<i>Transportspezifität der LeIRT-Proteine</i>	45
3.8	EXPRESSION DER LEIRT-GENE AUF RNA-EBENE	48
3.9	ANALYSE DER LEIRT-GENE	49
3.9.1	<i>Southern Blot-Analysen</i>	49
3.9.2	<i>Intron/Exon-Struktur der LeIRT-Gene</i>	50
3.9.3	<i>Inverse PCR-Versuche</i>	51
3.9.4	<i>Direkte PCR-Versuche</i>	52
3.9.5	<i>Transkriptionsstart der LeIRT-Gene</i>	53
3.9.6	<i>Übersicht über die LeIRT-Gene</i>	54
3.10	FE-REDUKTASEAKTIVITÄT DER EINZELLIGEN ALGE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	55
3.10.1	<i>Pflanzenphysiologische Beobachtungen</i>	55
3.10.2	<i>Etablierung eines Eisenchelat-Reduktasetests an Algen</i>	55
3.10.3	<i>Induktion der Fe^{3+}-Chelatreduktaseaktivität durch Eisenmangel</i>	56
3.10.4	<i>Abhängigkeit der Induktion von der Eisenkonzentration im Anzuchtmedium</i>	57
3.10.5	<i>Kinetik der Induktion der Fe^{3+}-Chelat-Reduktaseaktivität</i>	58
3.10.6	<i>Substratsättigung der Fe^{3+}-Chelat-Reduktaseaktivität</i>	59
3.10.7	<i>pH-Optimum der Fe^{3+}-Chelat-Reduktase</i>	60
3.10.8	<i>Einfluß von Inhibitoren auf die Fe^{3+}-Chelatreduktase</i>	60
3.10.9	<i>Rolle der Eisenchelat-Reduktase bei der Eisenaufnahme</i>	62
3.11	FE-TRANSPORTAKTIVITÄT DER EINZELLIGEN ALGE <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	64
3.11.1	<i>Induktion des Fe-Transports unter Eisenmangel</i>	64
3.11.2	<i>Valenz des transportierten Eisens</i>	65
3.11.3	<i>Inhibition der Fe-Aufnahme</i>	65
3.12	INTERAKTIONEN DES FE- UND DES CU-STOFFWECHSELS IN <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	67
4	DISKUSSION	71
4.1	MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG DES FE-TRANSPORTES IN TOMATEN	71
4.2	PHYSIOLOGIE DER FE-ASSIMILATION IN <i>CHLAMYDOMONAS</i>	85
	LITERATUR	94
	DANKE	106

1 Einleitung

Seit Jahrtausenden ist bekannt, daß die Düngung von Nutzflächen mit mineralhaltiger Asche das Pflanzenwachstum positiv beeinflusst. Systematische Untersuchungen hierzu wurden erstmalig von Justus von Liebig (1803 - 1873) durchgeführt. Er versuchte, die für das Pflanzenwachstum notwendigen mineralischen Elemente zu benennen und begründete damit das Forschungsgebiet der Pflanzenernährung. In der folgenden Zeit wurde die Einteilung der Nährstoffe in Makro- und Mikronährelemente aufgestellt. Zu den Makronährstoffen gehören Stickstoff, Phosphor, Schwefel, Kalium, Magnesium und Calcium, deren Rolle im Aufbau biologischer Moleküle oder als Osmotika besteht. Mikronährstoffe hingegen, mit Ausnahme des Bors, welches strukturelle Aufgaben in der Zellwand übernimmt, sind als Cofaktoren für Enzyme notwendig. Zu ihnen gehören Eisen, Mangan, Zink, Kupfer, Cobalt, Molybdän, Bor, Chlor und Nickel. Die Assimilation mineralischer Nährstoffe ist durch drei Merkmale gekennzeichnet:

- Selektivität: Einige Nährstoffe werden bevorzugt aufgenommen, andere werden ausgeschlossen.
- Akkumulation: Die Konzentrationen im Zellsaft können die des umgebenden Mediums zum Teil wesentlich übersteigen.
- Genotypische Variation: Es gibt deutliche Unterschiede in der Nährstoffaufnahme zwischen unterschiedlichen Pflanzenspezies.

Auf dem Weg in die Pflanze durchqueren hydratisierte Ionen die Poren des zusammenhängenden Raums der Zellwände, des Apoplasten. Bis auf einen schwachen Ionenaustauscher-Effekt, hervorgerufen durch freie Carboxylgruppen der Zellwand-Oligosaccharide, stellt der Apoplast für anorganische Ionen kein Hindernis dar. Die selektive Aufnahme von Nährstoffen erfolgt an der Plasmamembran der Wurzelzellen, wobei drei Mechanismen existieren: Uniport, H^+ -Symport und erleichterte Diffusion (Abb. 1). Es ist nicht bekannt, ob hydratisierte oder „nackte“ Ionen transportiert werden.

Eine zentrale Rolle bei der Ionenaufnahme kommt der plasmamembranären H^+ -ATPase zu. Unter ATP-Hydrolyse transportiert sie Protonen aus dem Cytosol in den Apoplasten. Der hieraus resultierende pH-Gradient und der elektrochemische Gradient liefern die Triebkraft für die meisten Transportvorgänge über die Membran. Das Membranpotential der meisten Pflanzenzellen liegt bei -120 bis -180 mV, der pH-Gradient liegt bei etwa 2 Einheiten (MARSCHNER 1986). Bei der Aufnahme von Kationen aus dem Boden erfolgt der Transport entlang des Potentialgradienten, erfordert also keine weitere Energetisierung, solange die Konzentration in der Zelle nicht wesentlich über der des umgebenden Mediums liegt. Anionen und ungeladene Moleküle benötigen eine Energetisierung durch H^+ -Symport, da sie entgegen dem elektrochemischen Potential transportiert werden. Schließlich erfolgt der Transport einiger Ionen durch Ionenkanäle, deren Öffnungszustand reguliert ist. Diese Kanäle sind selektiv für das transportierte Ion (Abb. 1).

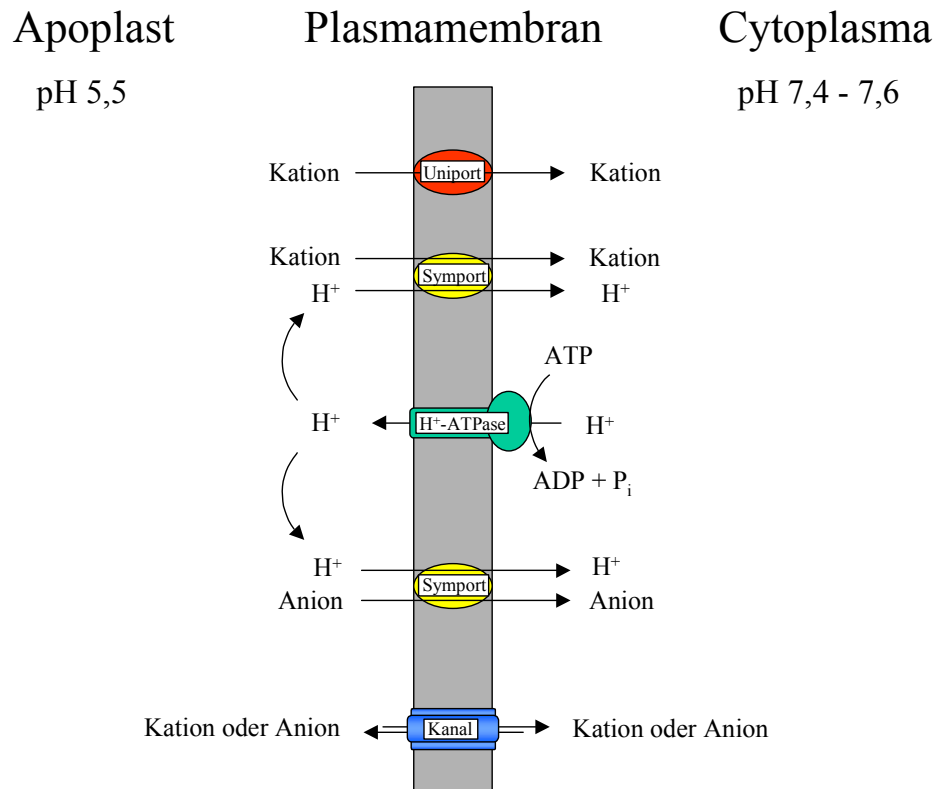


Abb. 1: Schema des Ionentransportes über die Plasmamembran von Wurzelzellen höherer Pflanzen (nach MARSCHNER 1986). Die durch die H^+ -ATPase erzeugte „protonenmotorische Kraft“, bestehend aus einem pH-Gradienten und einem Membranpotential über die Plasmamembran, treibt die Aufnahme verschiedener Ionen auch gegen einen Konzentrationsanstieg an. Der Ionentransport kann durch Uniporter entlang des Membranpotentials erfolgen, durch Symport mit Protonen (H^+) energetisiert sein oder ungerichtet durch kurzzeitig geöffnete Ionenkanäle erfolgen.

1.1 Bedeutung des Eisens in der Pflanzenernährung

Eisen-(Fe)-mangel ist Ursache der häufigsten ernährungsbedingten Krankheiten weltweit (http://www.who.int/nut/malnutrition_worldwide.htm#ida). Über 2,7 Milliarden Menschen sind davon betroffen. Er reicht zurück bis zu den primären Nahrungsproduzenten, den Pflanzen. Fe ist für die Ernährung höherer Pflanzen von entscheidender Bedeutung. Es ist Bestandteil zahlreicher Enzyme, die insbesondere Oxidations- und Reduktionsreaktionen katalysieren (Tabelle 1). Man unterscheidet zwischen Cytochromen und Enzymen, die nicht-Häm-gebundenes Fe enthalten. In beiden Fällen katalysiert Fe als prosthetische Gruppe die Ein-Elektronenübertragungsreaktionen durch seine leichte Fähigkeit zum Valenzwechsel zwischen den Oxidationsstufen +II und +III. Weiterhin ist Fe an der Biosynthese der Phytohormone Ethylen und Auxin sowie an der Porphyrinbiosynthese beteiligt. Letzteres zeigt sich unter Fe-Mangel durch das Ausbleichen der Blätter.

Tabelle 1: Übersicht über einige eisenhaltige Enzyme in Pflanzen

<u>Enzym</u>	<u>Art der Fe-Bindung</u>	<u>Aufgabe</u>
Aconitase	Fe-S-Cluster	Zitronensäurezyklus
Aminocyclopropan-carboxylat-Oxidase	Fe-S-Cluster	Ethylen-Biosynthese
Coproporphyrinogen-decarboxylase	Fe-S	Chlorophyllbiosynthese
Cytochrom B5-Reduktase	Häm	Fettsäure-Desaturierung
Cytochrom C	Häm	Zellatmung
Cytochrom C-Oxidase	Häm	Zellatmung
Fe ³⁺ -Chelat-Reduktase	Häm	Fe-Assimilation
Ferredoxin	Fe-S-Cluster	Photosynthese, Entgiftung
Katalase	Häm	Entgiftung
NADPH-Oxidase	Häm	Pathogenabwehr
Nitratreduktase	Häm	Stickstoff-Assimilation
Peroxidase	Häm	Oxygenasereaktionen, Entgiftung
Phytoferritin	Fe ³⁺	Eisenspeicherung
„Rieske“-Protein	Fe-S-Cluster	Photosynthese
Ribonucleotid-Reduktase	Fe-S-Cluster	DNA-Synthese
Superoxid-Dismutase	Fe-S-Cluster	Entgiftung

Obwohl Fe das vierthäufigste Element in der Erdkruste ist, stellt seine Verfügbarkeit ein Problem für die Pflanzenernährung dar. Eisenmangel führt weltweit zu erheblichen ökonomischen Schäden im Kulturpflanzenbau (VOSE 1982). Er äußert sich in Wachstumsretardierung und dem Auftreten von Chlorosen in den jüngsten Blättern, insbesondere in den intercostalen Regionen (Abb. 2). Fe ist, im Gegensatz zu anderen Ionen, einmal im Blatt festgesetzt, nur schwer wieder mobilisierbar, wodurch erklärbar wird, daß die Chlorosen in den jüngsten Blättern beginnen. Außerdem ist in vielen Pflanzen unter Fe-Mangel beeinträchtigt Wurzelwachstum bei gleichzeitiger Verdickung und stärkerer Verzweigung der Wurzeln zu beobachten (Abb. 2D; Abb. 4).

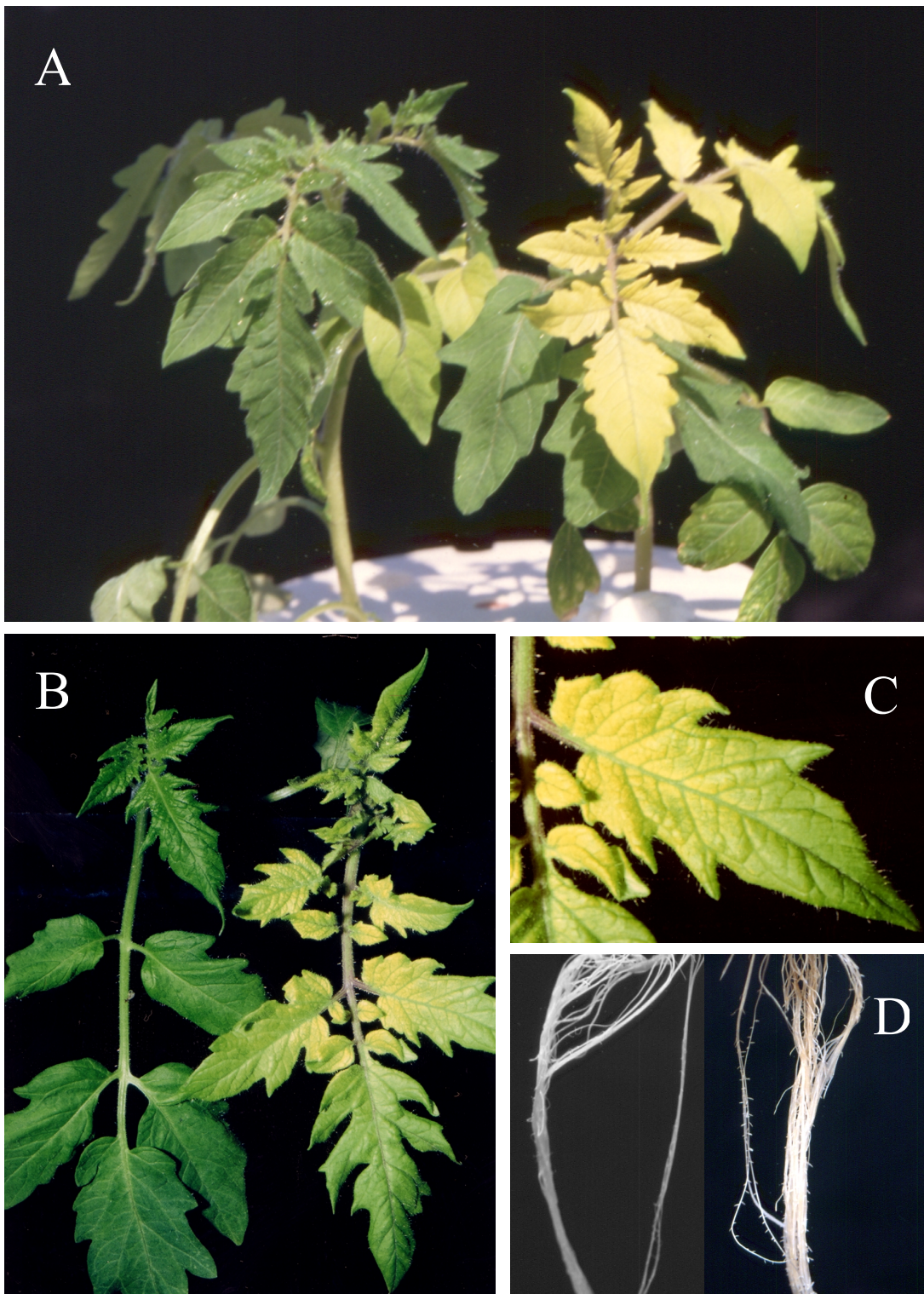


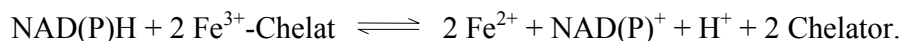
Abb. 2: Habitus und Morphologie eisensuffizient und eisendefizient gewachsener Tomatenpflanzen. Zwei Wochen alte Pflanzen wurden sechs Tage lang in Hydrokultur mit oder ohne Eisen herangezogen. A: Sprosse (links: +Fe; rechts: -Fe); B: Blätter (links: +Fe; rechts: -Fe); C: Blattausschnitt (-Fe); D: Wurzelmorphologie (links: +Fe; rechts: -Fe).

Der überwiegende Teil des Eisens im Boden liegt in Form außerordentlich schwerlöslicher Fe(III)-Oxide und -Hydroxide vor. Die Gleichgewichtskonzentration des freien Eisens $[\text{Fe}^{3+} + 3 \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{Fe}(\text{OH})_3]$ liegt bei neutralem pH bei 10^{-17} M und damit erheblich unter dem Bedarf höherer Pflanzen (10^{-6} bis 10^{-5} M, EPSTEIN 1972; GUERINOT UND YI 1994). Allein das Vorhandensein organischer Verbindungen im Boden, die in der Lage sind, Fe^{3+} zu komplexieren, bringt die Fe-Konzentrationen in einen Bereich, der das Pflanzenwachstum zuläßt. Zur Überwindung des Löslichkeitsproblems haben höhere Pflanzen zwei grundlegende Strategien entwickelt (Abb. 4):

1.2 Eisenassimilation in Pflanzen

Gräser (Poaceae, „Strategie II-Pflanzen“) scheiden hochaffine Komplexbildner, sog. Phytosiderophoren (PS), aus. Die PS binden Fe^{3+} und werden mit dem gebundenen Fe^{3+} über ein hochaffines Aufnahmesystem der Plasmamembran in die Wurzel-Epidermiszellen aufgenommen. Die Sekretion der PS wird durch Fe-Mangel induziert und unterliegt einem strengen, diurnalen Rhythmus (WALTER *et al.* 1995). Die Mais-Mutante *yellow stripes* (*ys1*) weist gelbe, chlorotische Streifen auf ihren Blattoberflächen auf. Sie ist in der Funktion der PS-Rezeptoren defizient (VON WIRÉN *et al.* 1994). Dieser PS-Rezeptor wurde kürzlich auf molekularer Ebene beschrieben (Elsbeth L. Walker, Bericht auf dem 10th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants; 14.–19. Mai 2000, Houston TX).

Die meisten anderen Pflanzen („Strategie I-Pflanzen“) reagieren auf Eisenmangel durch eine Reihe spezifischer Adaptationsreaktionen: Die Ansäuerung des äußeren Mediums, die Verkürzung und Verdickung der Wurzeln und die Bildung haariger Seitenwurzeln, innerhalb derer sich spezifische „Transferzellen“ ausbilden (LANDSBERG 1986) sowie die Induktion von Fe^{2+} -Transportern und einer plasmamembranständigen Eisenchelat-Reduktase (EC 1.6.99.13):



Diese NAD(P)H-abhängige Reduktase reduziert extrazelluläre Fe(III)-Chelate, woraufhin Fe^{2+} freigesetzt und anschließend über Fe-Transporterproteine in die Rhizodermiszellen aufgenommen wird. In der Nährlösung von Sojabohnen verhinderte das Abfangen von Fe^{2+} durch Fe(II)-spezifische, nicht-membrangängige Chelatoren den Transport von Fe, während Fe(III)-spezifische Chelatoren die Aufnahme nicht beeinträchtigten. Dies führte zu der Auffassung, daß Fe^{2+} , nicht Fe^{3+} in die Wurzeln aufgenommen wird, und daß die Wurzeln extrazelluläres Fe^{3+} reduzieren (CHANEY *et al.* 1972).

Das als Fe^{2+} aufgenommene Eisen wird innerhalb der Wurzelzellen schnell wieder zu Fe^{3+} oxidiert und durch den Xylemstrom in die oberen Pflanzenregionen transportiert. Dabei wird es durch organische Säuren wie Citrat oder Malat gebunden (MARSCHNER 1986). Außerdem scheint die aus drei Methionineinheiten zusammengesetzte, nicht-proteinogene Aminosäure „Nicotianamin“ im Eisentransport innerhalb höherer Pflanzen eine Rolle zu spielen, da die Tomatenmutante „*chloronerva*“, die Nicotianamin nicht synthetisieren kann, starke Eisenmangelercheinungen zeigt, obwohl sie tatsächlich ausreichende oder sogar erhöhte Eisenkonzentrationen in ihren Blättern aufweist. Durch Zufüttern von Nicotianamin wurden diese Mangelercheinungen auf-

gehoben (SCHOLZ *et al.* 1985). In den Chloroplasten der Mesophyllzellen wird Fe in Form von Phytoferritin, ein aus 24 identischen Untereinheiten zusammengesetztes Protein, das bis zu 4500 Eisenionen aufnehmen kann, gespeichert (BRIAT UND LOBRÉAUX 1997).

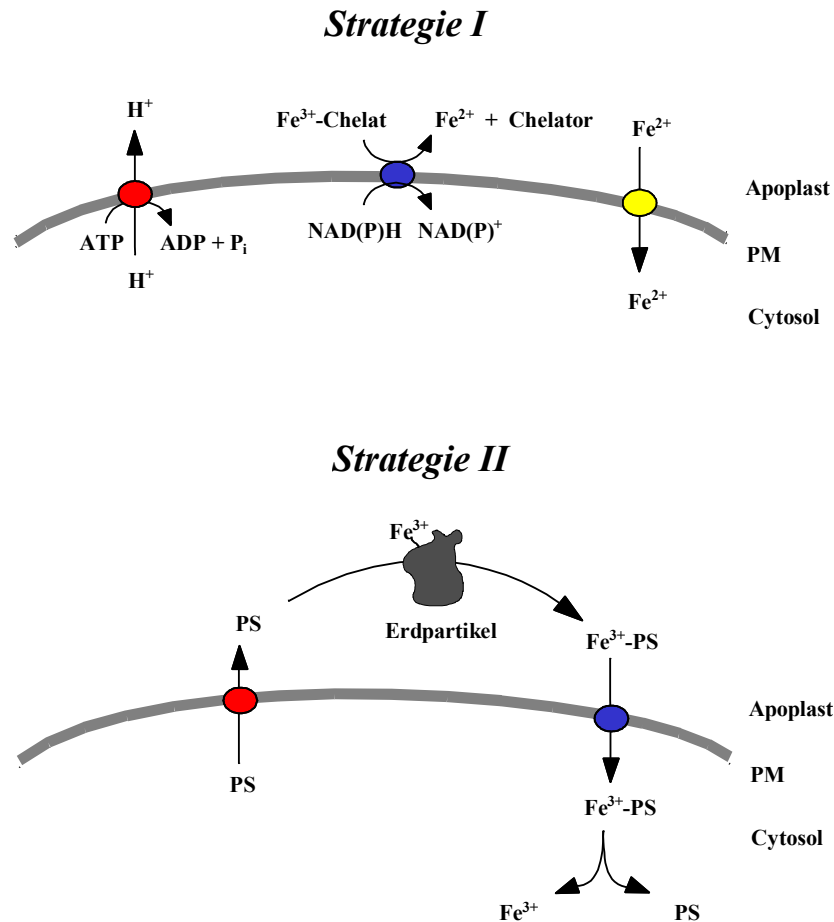


Abb. 3: Modell der beiden Eisenaufnahmemechanismen höherer Pflanzen. PS = Phytosiderophor, PM = Plasmamembran. Erläuterungen im Text.

1.2.1 Ansäuerung der Rhizosphäre

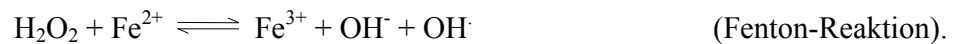
Die Löslichkeit von Fe^{3+} ist in saurer Umgebung erheblich größer als unter neutralen/basischen Bedingungen. Daher ist die in Kulturpflanzen, die auf kalkreichen, basischen Böden wachsen, häufig auftretende „Kalkchlorose“ auf Fe-Defizienz zurückzuführen, also eine „Eisenmangelchlorose“ (MARSCHNER 1986). Es ist demnach für Pflanzen sinnvoll, den pH-Wert der Rhizosphäre herabzusetzen, um die Fe-Verfügbarkeit zu erhöhen. Dies geschieht entweder durch die Sekretion organischer Säuren oder durch die direkte Protonenausscheidung über die H^+ -ATPase der Plasmamembran (LANDSBERG 1981A, BIENFAIT 1985). Tatsächlich wurden in Sonnenblumen (LANDSBERG 1981B) sowie in isolierten Plasmamembranen aus Gurkenwurzeln erhöhte H^+ -ATPase-Aktivitäten unter Fe-Mangel gemessen (RABOTTI UND ZOCCHI 1994). Die Ausscheidung organischer Säuren wird kontrovers diskutiert. Es wurde spekuliert, daß die erhöhte H^+ -Ausscheidung zu einer verstärkten Phosphoenolpyruvat-Carboxylaseaktivität, hervorgerufen durch

die Alkalinisierung des Cytoplasmas, führt. Dadurch kann die gesteigerte Produktion von Äpfelsäure erklärt werden, aber nicht ihre Sekretion (DE VOS *et al.* 1986).

Die für die Fe-Solubilisierung verantwortliche H^+ -ATPase ist auf molekularer Ebene nicht bekannt. Die einzige, in Wurzeln nennenswert exprimierte H^+ -ATPase ist das Produkt des *AHA2*-Gens. In Northern-Blot-Analysen konnte jedoch kein Einfluß der Fe-Ernährung auf die *AHA2*-Transkriptmenge in *Arabidopsis*-Wurzeln gefunden werden (E.E. Rogers, Hanover, NH, pers. Mitt.).

1.2.2 Eisenreduktion an der Plasmamembran von Wurzelzellen

Die Expression der Eisenchelate-Reduktase ist der regulatorische Schritt der Fe-Assimilation. Sie ist streng reguliert: Ein Überschuß an reduziertem Fe im Cytoplasma katalysiert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, die toxisch für die Zellen sind (Fenton-Reaktion; HALLIWELL UND GUTTERIDGE 1989).



Permanent erhöhte Eisenchelate-Reduktaseaktivität führt zur Eisentoxizität: Die „*bronze*“- und die „*dgl*“-Mutante, zwei Erbsenmutanten, deren Eisenchelate-Reduktase konstitutiv exprimiert wird, zeigen bronzefarbene Flecken auf ihren Blattoberflächen. Diese zeugen von Fe-Toxizität durch erhöhte Fe-Akkumulation (KNEEN *et al.* 1990, WELCH UND LARUE 1990).

Induktion der Fe-Chelatreduktase unter Fe-Mangel

Schon bald nach den grundlegenden Experimenten von CHANEY *et al.* 1972 wurde gezeigt, daß die Fe^{3+} -Reduktase unter Eisenmangel stark induziert wird. BIENFAIT 1988 berichtete von einer „Turbo-Reduktase“, die bei Eisenmangel induziert werde und spezifisch Eisenchelate reduziere, während die „Standard-Reduktase“ konstitutiv und eher unspezifisch sei. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Reduktasen sei durch die Substrate Fe^{3+} -Chelat (Turbo-Reduktase) bzw. Hexacyanoferrat(III) (Standard-Reduktase) möglich (als Überblick: BIENFAIT 1988, LÜTHJE *et al.* 1997). Bei Erbsen wurde gemessen, daß im Laufe der Pflanzenentwicklung die Eisenchelate-Reduktaseaktivität in den Wurzeln kurz nach der Blütenentwicklung stark ansteigt, um die Versorgung der neugebildeten Samen mit Fe zu gewährleisten. Dieser natürliche Aktivitätsanstieg kann durch Eisenmangel etwa fünffach gesteigert werden (GRUSAK 1995). Es wurde postuliert, daß der Eisenbedarf in den importierenden Organen über ein noch nicht charakterisiertes Signal die Aktivität der Eisenchelate-Reduktase reguliert (GRUSAK UND PEZESHGI 1996). Man vermutet, daß dieses Signal ein lösliches Polypeptid ist, das durch den Phloemstrom transportiert wird (E. Marentes und M. Grusak, Vorträge auf dem „9th International Workshop on Iron Nutrition“, 20.-25. Juli 1997 in Hohenheim). Abb. 4 zeigt die Induktion der Eisenchelate-Reduktaseaktivität am Beispiel eisengehungerter und eisensuffizienter Tomatenwurzeln.

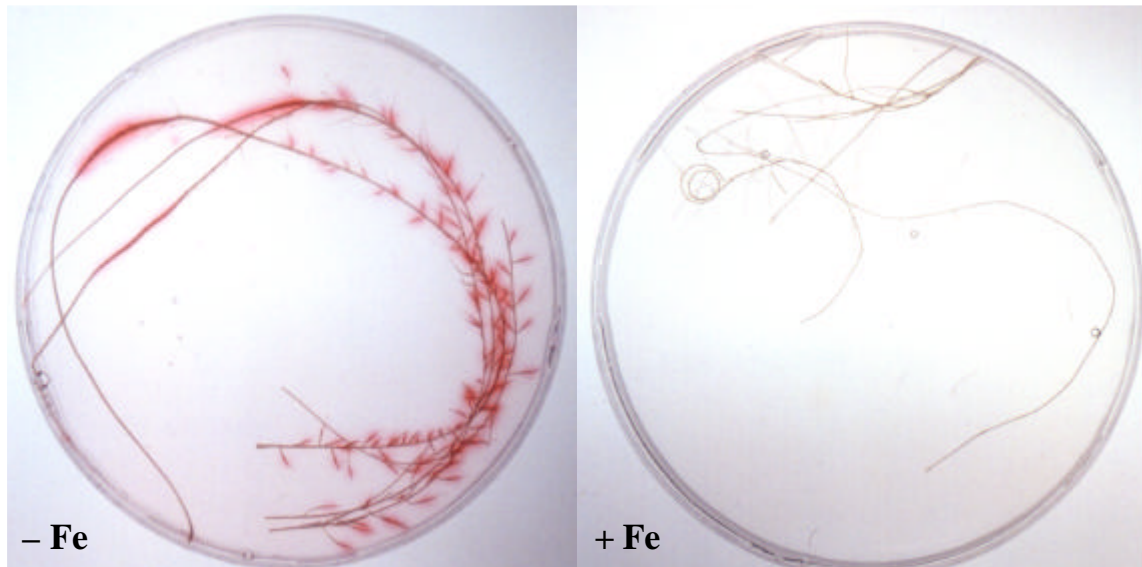


Abb. 4: Eisenchelatreduktaseaktivität eisengehungelter (links) und eisensuffizienter (rechts) Tomatenwurzeln: Zwei Wochen alte Pflanzen wurden sechs Tage lang in Hydrokultur mit und ohne Fe herangezogen. Ihre Wurzeln wurden abgeschnitten und in Agarose mit 250 μM Fe^{3+} -Citrat und 750 μM BPDS eingebettet. Die rote Farbe rund um die Wurzeln zeigt Fe^{3+} -Chelat-Reduktaseaktivität an. Auch die veränderte Wurzelmorphologie unter Fe-Mangel wird deutlich.

Fe^{3+} -Chelat-reduzierende Enzyme konnten in vielen Pflanzen, darunter auch in Mais (Strategie II-Pflanzen), nachgewiesen werden. Ihre Lokalisierung ist keineswegs auf Wurzeln beschränkt (als Übersicht: MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). Die Rolle dieser Enzyme in Sprossen ist bisher weitgehend ungeklärt. Möglicherweise spiegeln sie den allgemeinen Redox-Zustand der Zellen wider, andererseits könnte auch der Fe-Transport innerhalb der Pflanzen durch mehrfache Oxidationen und Reduktionen des Eisens reguliert sein (P. Moog, Frankfurt/M. pers. Mitt.).

Physiologische und biochemische Charakterisierung der Eisenchelatreduktasen

Die Fe^{3+} -Chelatreduktasen wurden insbesondere in Erbsen- und Tomatenwurzeln untersucht. BUCKHOUT *et al.* 1989 zeigten, daß die Fe^{3+} -Reduktaseaktivität plasmamembrangebunden ist. In diesen Versuchen wurde die Fe^{3+} -Reduktaseaktivität isolierter Plasmamembranvesikel in Gegenwart verschiedener Substrate gemessen. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß die Reduktase *in vitro* NADH-, und nicht NADPH-abhängig ist. Die Eisenchelatreduktasen aller bisher untersuchten Pflanzenspezies waren durch Protonophoren und sulfhydrylspezifische Reagenzien inhibierbar (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994, SCHMIDT 1994), was darauf hinweist, daß der Energiezustand der Zelle sowie Cysteinreste eine Rolle in der extrazellulären Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten spielt. In Fe-defizienten Bohnenwurzeln wurde die Depolarisation des Membranpotentials nach Fe-Zugabe gemessen. Es wurde gezeigt, daß die transplasmamembranäre Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten und Ferricyanid ein elektrogener Prozeß ist

(SIMONS *et al.* 1984).

Versuche, die Fe^{3+} -Chelatreduktase zur Homogenität zu reinigen, waren bisher ohne Erfolg (HOLDEN *et al.* 1991; HOLDEN *et al.* 1994; Frank Turano, USDA, Beltsville, MD, pers. Mitt.). Sie endeten reproduzierbar mit einem Protein, das im SDS-Gel eine 35 kDa-Bande lieferte, jedoch keine Reduktaseaktivität mehr zeigte. Dieses Protein wurde nach tryptischem Verdau ansequenziert und vier Peptidsequenzen wurden identifiziert (M. Holden und F. Turano, pers. Mitt.). Mit der Sequenzinformation konstruierte man degenerierte Oligonukleotide, um damit PCR-Experimente durchzuführen. Diese blieben jedoch erfolglos. Später erschien ein *Arabidopsis*-EST in der Datenbank, dessen translatierte Proteinsequenz Homologie zu den Peptidsequenzen aufweist. Dieser Klon wurde mir von Frank Turano zur Verfügung gestellt.

Das *Screening* einer cDNA-Bank aus eisengehungerten Tomatenwurzeln (s. 3.4) mit dem *Arabidopsis*-EST führte zur Isolierung von cDNAs mit Homologie zu NADH-abhängigen Cytochrom-b5-Reduktasen (eigene unveröffentlichte Daten; FUKUCHI *et al.* 1999). Diese Proteine sind in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Ihre Funktion liegt in der Desaturierung von Fettsäuren und keineswegs in der Reduktion von Fe^{3+} . Ähnliche Ergebnisse wurden von Paolo Bagnaresi und seinen Mitarbeitern in Bologna erzielt. Ihnen gelang die Reinigung von Enzymen aus Mais und Tomatenwurzeln, die die Reduktion von Eisencitrat *in vitro* katalysieren (BAGNARESI *et al.* 1997). Diese Proteine erwiesen sich ebenfalls als Cytochrom-b5-Reduktasen (BAGNARESI *et al.* 1999). Ihre physiologische Bedeutung in der Fe-Ernährung ist nicht geklärt.

Genetische Ansätze zur Identifizierung der Fe^{3+} -Chelatreduktase

Die Untersuchung mehrerer zehntausend transposonmarkierter und chemisch mutagenisierter *Arabidopsis*-Pflanzen führte zur Isolation von Mutanten (*frd1* und *frd3*), die in der Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktase unter Fe-Mangel defizient sind (YI UND GUERINOT 1996, DELHAIZE 1996). Die *frd1*-Mutanten haben keine oder nur sehr begrenzte Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität unter Fe-Mangel, während *frd3*-Mutanten hohe Aktivität, auch unter Fe-suffizienten Bedingungen zeigen. Die korrekte Ansäuerung des Wachstumsmediums der *frd1*-Pflanzen unter Fe-Mangel weist darauf hin, daß die *frd1*-Mutation tatsächlich die Fe^{3+} -Chelatreduktase und nicht eine regulatorische Komponente betrifft (YI UND GUERINOT 1996). Die *frd1*-Mutation wurde kartiert. Sie befindet sich auf dem oberen Arm von Chromosom 1 (YI UND GUERINOT 1996). Inzwischen ist dieser Chromosomenabschnitt im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojektes sequenziert worden.

Fe^{3+} -Reduktasen und Pathogenabwehr

Die Fe^{3+} -Chelatreduktasen aus Hefen (s.u.) weisen signifikante Homologien zur katalytischen Untereinheit gp91^{phox} der mammalischen Phagozyten-Oxidase auf. Dieses Enzym, auch *respiratory burst oxidase* genannt, reduziert Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) und initiiert damit die massenhafte Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate (ROS), die die Pathogene oxidativ

schädigen. In Pflanzen dienen die ROS außerdem als Signalmoleküle für die Induktion weiterer Abwehrmechanismen, wie dem induzierten Zelltod in der Nachbarschaft der befallenen Pflanzenteile und der „*systemic acquired resistance*“, einer Art Gedächtnis, die die anderen Pflanzenteile vor dem erneuten Befall desselben Pathogens schützt (als Überblick: WOJTASZEK 1997). Verschiedene Gemeinsamkeiten existieren zwischen den Fe^{3+} -Chelatreduktasen aus Hefe und mammalischen Phagozyten-Oxidasen: Beide katalysieren trans-plasmamembranäre Ein-Elektronenübertragungs-Reaktionen. Beide sind hochglycosyliert, enthalten zwei Hämgruppen sowie Flavinbindungsstellen, und sie benötigen NADPH als Elektronendonator. Die Fe^{3+} -Reduktasen übertragen die Elektronen auf Fe(III) -Chelate, während die Phagozytenoxidasen O_2 als Substrat haben (DANCIS *et al.* 1992, SHATWELL *et al.* 1996, WOJTASZEK 1997).

Die Phagozytenoxidase ist bislang nur in Säugern näher charakterisiert worden: Sie besteht aus den katalytischen Membranproteinen gp91^{phox} und p22^{phox} und aus den assoziierten cytosolischen Proteinen p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox}. Ihre Aktivität benötigt Ca^{2+} und wird durch Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert (WOJTASZEK 1997).

Mit Hilfe des ESTs D39082 wurde von Quentin Groom in der Arbeitsgruppe von Prof. Nigel J. Robinson (Newcastle-upon-Tyne, England) das Reis-Gen „*rbohA*“ (respiratory burst oxidase homolog) isoliert (GROOM *et al.* 1997). Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu gp91^{phox} aus Maus und zu *FRE1* aus Hefe schlossen die Autoren, daß es sich bei dem Genprodukt um eine NADPH-Oxidase handele. Da Reis zu den Gräsern (Strategie II-Pflanzen) gehört, wurde dem Gen keine Rolle in der Eisenassimilation zugeordnet, sondern eine Funktion in der Pathogenabwehr postuliert. Kurz darauf wurde eine *Arabidopsis*-Sequenz isoliert, die die Gene „*FrohA*“ und „*FrohB*“ enthielt (Abb. 5). Die RNA dieser putativen Fe^{3+} -Chelatreduktasen ist außerordentlich gering exprimiert, dennoch gelang es Groom, für *FrohB* eine cDNA zu isolieren (ROBINSON *et al.* 1997). Diese cDNA konnte jedoch nicht den eisenchelatreduktase-defizienten Phänotyp von *fre1, fre2*-Hefemutanten komplementieren (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse).

Das *FrohB*-Gen, später in „*FRO2*“ umbenannt, kartiert auf demselben Chromosomenabschnitt wie die *frd1*-Mutation. Die Sequenzanalyse der aus zwei *frd1*-Mutanten isolierten *FRO2*-Allele zeigte, daß beide Mutanten im *FRO2*-Gen Mutationen tragen. Schließlich konnte das *FRO2*-Gen in den *frd1*-Mutanten den Fe-Chelatreduktase-defizienten Phänotyp komplementieren (ROBINSON *et al.* 1999). Diese Daten ließen keinen Zweifel daran, daß das *FRO2*-Gen für die Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Arabidopsis*, oder zumindest eine Komponente davon codiert. Eine C-terminale Domäne des *FRO2*-Proteins zeigt signifikante Homologie zu mammalischen p22^{phox}-Proteinen. Dies führte zu der Vermutung, daß *FRO2* in *Arabidopsis* als transmembranäre Komponente für die Fe^{3+} -Reduktase ausreicht und keine weiteren Untereinheiten benötigt (ROBINSON *et al.* 1999).

In neueren Arbeiten konnten mindestens sechs NADPH-Oxidasegene aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden (TORRES *et al.* 1998), die sich phylogenetisch von den *FRO*-Genen unterscheiden (M.L. Guerinot, pers. Mitt.).

FRE1 : LGWMGIWSMAGILCFDRFCRIVRIIMNGGLKATATLSTTDDSNVTKISVKKPKPFVKYQVG : 441
 gp91phox : MTWKWIVGPF-MFLYLICERLVRVFRSQQK--VVIITKVVTHP-FKTIETQMKKK-GFKMEVG : 322
 Fro2 : ISFSFIALPGFYIIFLVDRLFRFLQSRN--VRLLAARILP-SDTMELTFSKNSKLVSPST : 365
 RbohD : TTWMYLAVP-ILLYASERLLRAFRSSIKP-VKMIKVAVYP-GNVLSLHMTKPCQGFYKSC : 644

FRE1 : AFAYMYFLSPKSAWFYSFQSHPFTVLSERHRDPN-NPDQLTMYVKANKGITRVLLS---K : 497
 gp91phox : Q--YIFVKCPK---VSKLEWHPFTLTSA----P--EEDFFSIHIRIVGDWTEGLFN---- : 367
 Fro2 : S--IMFVNIPS---ISKLQWHPFTITSS---SKLEPEKLSIVIKKECKMSTKLHQ--- : 412
 RbohD : Q--FMLVNCRA--VSPFEWHPFSITSA----P--GDDYLSVHIRTLGDWTRKRLRTVFSE : 693

FRE1 : VLSAPNH-----TVDCK-----IFLEGPGYGVTVPHIAKLKR-NLVGVAAGLIG-VAA : 541
 gp91phox : ACGCDKQ-----EFQDAWK---LPKIAVDGPGFGTASADFVSYEVMVLVAGIGVTPFAS : 418
 Fro2 : RLSSDDQ-----IDRLA-----VSVBGPYGPASADFLRHEALVMLVCGSGSITPFIS : 458
 RbohD : VCKPPTAGKSGLLRADGGDGNLPFPKVLIDGPGYGAPAQDYKKYDVVLVGLGIGATPMIS : 753

FRE1 : IYPHFVECLR----- : 551
 gp91phox : ILKSVWYKY----- : 427
 Fro2 : VIRDLIATSQKETCKIPKITLICAFKKSSEISMDDLVLPLSGLETELSSDINIKIEAFIT : 518
 RbohD : ILKDIINNMK-----GPDRLSDIENNNS : 776

Abb. 5: Ausschnitt aus dem ClustalW-Vergleich einiger Polypeptide mit Homologie zur Eisenchelat-Reduktase Fre1p aus Hefe (vom Januar 1997). Einige funktionelle Sequenzbereiche wie die Häm- und die FAD-Bindungsstellen (unterstrichen) sind hochkonserviert. Die Gesamtsequenzen sind jedoch nur mäßig homolog.

Das durch die Fe^{3+} -Chelatreduktase bereitgestellte freie Fe^{2+} wird in die Wurzelzellen transportiert. In Erbsen wurde gezeigt, daß nicht die Fe^{2+} -transportierenden Enzyme, sondern die Fe^{3+} -Chelatreduktase limitierend für die Fe-Assimilation ist (GRUSAK *et al.* 1990). Dabei ist noch immer offen, ob diese Aufnahme durch Fe^{2+} -spezifische oder unspezifische divalente Kationen-transporter erfolgt. Neuere molekularbiologische Studien geben Hinweise auf einen wenig spezifischen Kationentransport: In Hefemutanten überexprimiert transportierte der „eisen-regulierte Transporter“ *IRT1* aus *Arabidopsis thaliana* außer Fe^{2+} eine Reihe anderer zweiwertiger Metallionen (EIDE *et al.* 1996, KORSHUNOVA *et al.* 1999). Dazu gehören Zn und Mn, und wahrscheinlich auch Cd und Co. Außerdem erwiesen sich Hefen (D. Eide, Columbia, MO, pers. Mitt.) und transgene Pflanzen (M.L. Guerinot, Hanover, NH, pers. Mitt.), die das IRT1-Protein überexprimierten, als hypersensitiv gegenüber Cd im Medium. Trotz ihrer geringen Spezifität muß man annehmen, daß die IRT-Proteine eine physiologische Rolle in der Fe-Assimilation besitzen. Expressionsstudien zeigten, daß die Transkriptmenge von *IRT1* unter Fe-Mangel, aber nicht durch Defizienz anderer Kationen, stark erhöht wurde (EIDE *et al.* 1996). Außerdem hatte die Fe^{3+} -Chelatreduktase-defiziente *Arabidopsis*-Mutante „*frd1*“ erhöhte *IRT1*-Transkriptmengen, während eine andere Mutante („*frd3*“), die konstitutiv erhöhte Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität aufweist, ebenfalls stark erhöhte *IRT1*-Transkriptlevel zeigte (EIDE *et al.* 1996). Physiologische Studien zeigten, daß viele Pflanzen unter Fe-Mangel erhöhte Gehalte anderer divalenter Kationen in ihren Sprossen aufweisen (WELCH *et al.* 1993, YI UND GUERINOT 1996). Diese Daten weisen

ebenfalls darauf hin, daß das IRT1-Protein auch andere Kationen transportiert. Kürzlich ist die Komplementation von eisen- und mangantransportdefizienten Hefemutanten sowie erhöhte Cd-Sensitivität dieser Hefen, durch Proteine der *Natural resistance associated macrophage protein* (*Nramp*)-Familie aus *Arabidopsis* beschrieben worden. Hierbei wurden jedoch kaum Transportdaten gezeigt und einige der gezeigten Daten lassen durchaus unterschiedliche Interpretationen zu (THOMINE *et al.* 2000).

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben den oben beschriebenen, wenig spezifischen Kationentransportern auch Fe-spezifische Aufnahmemechanismen existieren.

1.2.4 Eisenassimilation einzelliger Algen

Die sogenannte „Eisen-Hypothese“ postuliert, daß die Biomasse-Produktion in den Ozeanen durch Eisen limitiert ist (MARTIN UND FITZWATER 1988). Dies hat enormen Einfluß auf die weltweite CO₂-Fixierung, so daß ernsthafte Überlegungen bestehen, die Ozeane mit Fe zu düngen um damit den Treibhauseffekt einzudämmen (BEHRENFELD UND KOLBER 1999). Trotz dieser globalen Rolle des Eisens in der Ernährung des Phytoplanktons ist über die Eisenassimilation einzelliger, eukaryotischer Algen recht wenig bekannt. Man nahm zunächst an, daß diese sich in der Konkurrenz zu anderen Mikroorganismen der Siderophoraufnahme bemächtigen. In den achtziger Jahren wurde daher die Eisenassimilation der Alge *Chlorella vulgaris* mit eisenbeladenen Siderophoren untersucht. Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie wurde das Verschwinden des Fe³⁺-Signals und damit die Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ gemessen. Diese Methode funktionierte jedoch nur bei sehr fest gebundenem Fe³⁺, also bei Siderophorkomplexen. Bei weniger festen Komplexen wie z. B. Fe³⁺-Citrat verbreiterte sich das Fe³⁺-Signal so stark, daß es kaum vom Grundrauschen zu unterscheiden war. Gleichzeitig wurde die Aufnahme von radioaktivem Fe gemessen. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß siderophorgebundenes Fe reduktiv assimiliert wird (ALNUTT UND BONNER 1987A und ALNUTT UND BONNER 1987B). Sie konnten jedoch nicht unterscheiden, ob das Fe erst reduziert und dann aufgenommen wird, oder umgekehrt.

MOOG UND BRÜGGEMANN 1994 maßen der Eisenreduktion in *Chlorella pyrenoidosa* zur Eisenassimilation keine große Bedeutung zu. Sie konnten zwar die Reduktion von Eisenchelaten messen, fanden aber keine Substratsättigung. Daraus schlossen sie, daß die Reduktionsaktivität eine unspezifische Reaktion sei.

In der marinen Grünalge *Scenedesmus incrassatulus* wurde siderophorvermittelte Eisenaufnahme nachgewiesen (BENDERLIEV UND IVANOVA 1994).

In der halophilen Alge *Dunaliella salina* wurde ein Transferrin-ähnliches Protein nachgewiesen, das Fe³⁺ bindet und offenbar den Eisentransport vermittelt (FISHER *et al.* 1998). Dieses Protein ist durch die Salzkonzentration im Medium reguliert.

Im Laufe dieser Arbeit erschien eine Veröffentlichung, die die Induktion der Ferricyanid- und der Eisenchelat-Reduktase in *Chlamydomonas reinhardtii* durch Eisendefizienz zum Thema hatte (LYNNES *et al.* 1998). Die Ergebnisse dieser Autoren decken sich teilweise mit den in dieser Arbeit dargestellten (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998).

1.3 Eisenassimilation in Hefe

In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist die Eisenassimilation vergleichsweise gut untersucht. Man vermutete zunächst, daß Hefen, ähnlich wie Bakterien und die meisten Pilze, Siderophoren zur Eisenassimilation benutzen. Obwohl Hefen selbst keine Siderophoren synthetisieren, wurde gezeigt, daß sie siderophorgebundenes Fe^{3+} aufnehmen können (LESUISSE *et al.* 1987). Neuere Studien konnten einen Siderophor- Fe^{3+} -Transporter (Sit1p) identifizieren. Dieser verleiht eisentransportdefizienten Stämmen die Möglichkeit, in Gegenwart des Pilzsiderophors DesferrioxaminB (DFOB) zu wachsen (LESUISSE *et al.* 1998). Der siderophorvermittelte Eisen-transport scheint jedoch in Hefe nur einen „räuberischen“ Nebenweg darzustellen. Der Hauptweg der Fe-Assimilation in Hefe ist reduktiv. Unter Eisenmangel induzieren Hefen eine Eisenchelatreduktase, die das zur Eisenaufnahme notwendige Fe^{2+} bereitstellt (DANCIS *et al.* 1990). Das reduzierte Fe wird über ein hochaffines ($K_m \approx 0,15 \mu\text{M}$) und ein niedrigaffines ($K_m \approx 30 \mu\text{M}$) Aufnahmesystem aufgenommen (EIDE *et al.* 1992). Der hochaffine Fe-Transport ist streng kupferabhängig: Cu-Mangel oder Mutationen in Genen des Cu-Transportes führen sekundär zur Fe-Defizienz. Viele Komponenten der Fe-Assimilation in Hefe sind auf molekularer Ebene bekannt (als Überblick: EIDE 1998). An dieser Stelle sollen vier Genprodukte näher besprochen werden: die Fe^{3+} -Chelatreduktase Fre1p, der niedrigaffine Fe^{2+} -Transporter Fet4p und die zwei Komponenten des hochaffinen Fe-Transportes Fet3p und Ftr1p.

1.3.1 Biochemische und genetische Charakterisierung der Eisenreduktasen in Hefe

Erste Hinweise, daß die Fe^{3+} -Chelatreduktasen in Hefe selbst Cytochrome sind, lieferten Häm-defiziente Hefemutanten. Sie erwiesen sich auch als Fe^{3+} -Reduktase-defizient. Durch Zufüttern von δ -Aminolävulinsäure, einem Baustein der Häm-Biosynthese, wurden diese Defekte supprimiert (LESUISSE *et al.* 1987). Die erste echte Fe^{3+} -Chelatreduktase-Mutante wurde 1990 beschrieben: Sie hatte erhebliche Wachstumsdefizite auf Fe-limitiertem Medium, zeigte keine Induktion der Fe-Reduktaseaktivität unter Fe-Mangel und war in der Lage, angebotenes Fe^{2+} aber nicht Fe^{3+} zu transportieren (DANCIS *et al.* 1990). Diese Mutante wurde komplementiert und das *FRE1*-Gen wurde isoliert. Es erwies sich als Fe-Mangel-induziert und entsprechende Promotorbereiche konnten identifiziert werden (DANCIS *et al.* 1992).

Das Fre1-Protein ist hydrophob mit 5 oder 6 vermuteten Transmembrandomänen. Die Sequenz weist auf zwei Häm-Bindungsstellen, eine Flavin-Bindungsstelle sowie eine NAD(P)H-Bindungsstelle hin (DANCIS *et al.* 1992). Außerdem wurden Sequenz-, und vor allem Strukturhomologien zur katalytischen Untereinheit der mammalischen Phagozyten-Oxidase gp91^{phox} gefunden. Spektroskopische Daten zeigten, daß das Fre1-Protein ein Cytochrom vom b-Typ ist (SHATWELL *et al.* 1996). Zur biochemischen Charakterisierung des Proteins wurde das *FRE1*-Gen in Hefe überexprimiert. Dabei konnte jedoch keine gesteigerte Fe-Reduktaseaktivität in isolierten Membranfraktionen gemessen werden (LESUISSE *et al.* 1996). Aus diesen Daten und aus den erfolglosen Bemühungen verschiedener Arbeitsgruppen, *fre*-Mutanten mit pflanzlichen cDNAs funktionell zu komplementieren, wurde geschlossen, daß die Fe^{3+} -Reduktase in Hefe wahr-

scheinlich ein Multienzymkomplex ist.

Durch Sequenzähnlichkeiten zu *FRE1* wurde das *FRE2*-Gen identifiziert, dem ebenfalls eine Rolle in der Fe-Assimilation zugesprochen wird (GEORGATSOU UND ALEXANDRAKI 1994). In unserem Labor konnte die Funktion des Fre2-Proteins in Hefemutanten nicht reproduziert werden, *fre2*-Mutanten zeigten im Hinblick auf die Fe^{3+} -Reduktion keinen Unterschied zu ihrem Wildtyp (eigene unveröffentlichte Ergebnisse). Insgesamt ist die physiologische Funktion des Fre2-Proteins eher fraglich, da in Komplementationsversuchen immer nur das *FRE1*-, aber nie das *FRE2*-Gen isoliert wurde (E. Lesuisse, Paris, pers. Mitt.). Es gibt ein einziges Beispiel, in dem die Fe-Reduktasegene aus Hefe funktionell überexprimiert wurden: In Blättern transgener Tabakpflanzen führte die Expression des Fre1- und vor allem des Fre2-Proteins zu gesteigerter Eisenchelatreduktaseaktivität (SAMUELSEN *et al.* 1998).

1.3.2 Molekulare Charakterisierung der Fe-Transporter in Hefe

Physiologische Charakterisierungen des Fe-Transportes in Hefe hatten zwei Aufnahmesysteme identifiziert, die Fe^{2+} mit unterschiedlichen Affinitäten (K_m -Werte von 0,15 bzw 30 μM) transportieren (EIDE *et al.* 1992).

Die Arbeiten von ASKWITH *et al.* 1994 und DANCIS *et al.* 1994A beschreiben die Identifizierung von eisenaufnahmedefizienten Hefemutanten und die anschließende Isolation der entsprechenden Gene. In beiden Fällen wurden Gene isoliert, die mit dem hochaffinen Fe-Transport in Zusammenhang stehen, nämlich das *FET3*-Gen (ASKWITH *et al.* 1994), das für die kupferhaltige Ferroxidase codiert, und das *CTR1*-Gen (DANCIS *et al.* 1994A), das für einen Cu-Transporter codiert. Eine Mutation im Kupfertransportergen *CTR1* verhinderte die Kupfer- und die hochaffine Eisenaufnahme, während die *fet3*-Mutante nur im hochaffinen Fe-Transport defizient war. Das Fet3-Protein enthält nur eine Transmembrandomäne und kam daher als putativer Fe-Transporter nicht in Betracht. Dafür wurden Eigenschaften gefunden, die für kupferhaltige Oxidasen typisch sind. Tatsächlich wurde Kupfer als wichtiger Cofaktor im Genprodukt von *FET3* identifiziert. Das Modell einer Ferroxidase, die das durch die Fe(III)-Reduktasen bereitgestellte Fe^{2+} erkennt und wieder zu Fe^{3+} re-oxidiert (Abb. 6), wurde aufgestellt und in verschiedenen Arbeiten experimentell belegt (EIDE 1998). Kürzlich wurde das Gen für den hochaffinen Eisentransporter Ftr1p isoliert. Er ist mit dem *FET3*-Genprodukt assoziiert und beide Proteine sind einzeln nicht funktionell (STEARMAN *et al.* 1996).

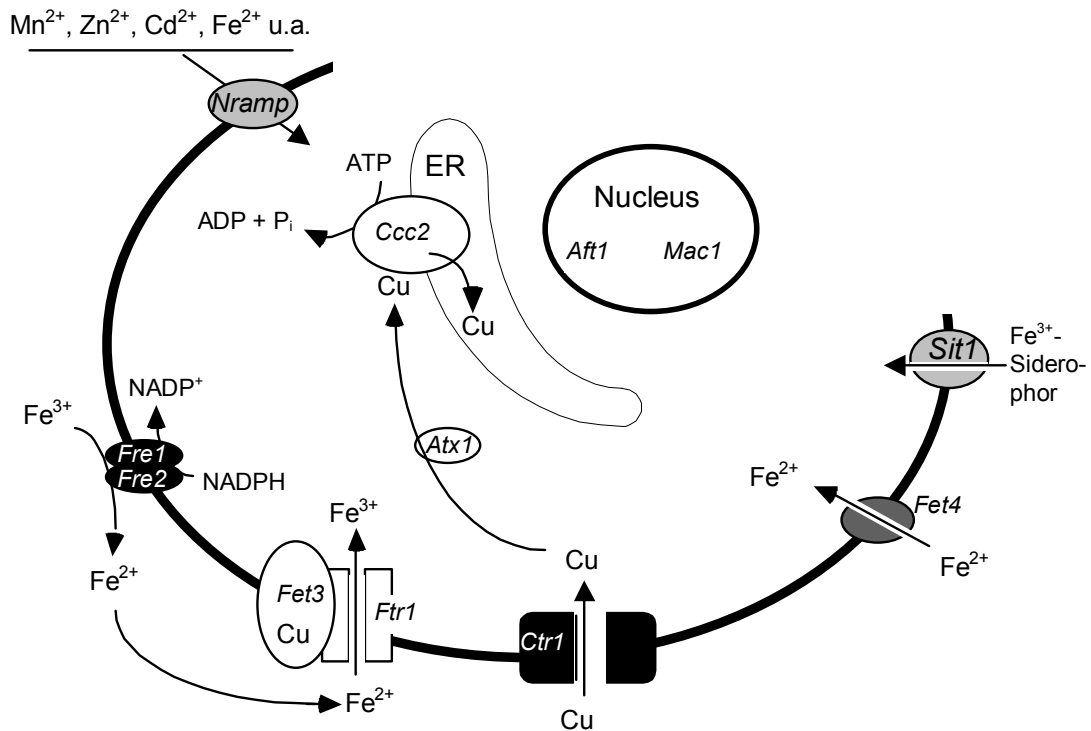


Abb. 6: Modell der Eisenaufnahme in *Saccharomyces cerevisiae* (nach EIDE 1998): Fe^{3+} -Ionen werden von Eisenchelatreduktasen (*Fre1p* und *Fre2p*) außerhalb der Zelle zu Fe^{2+} reduziert und damit mobilisiert. Das gebildete Fe^{2+} wird durch den niedrigaffinen Transporter Fet4p transportiert, oder vom hochaffinen Oxidase-Permease-Komplex bestehend aus den Proteinen Fet3p und Ftr1p erkannt. Fet3p ist eine Oxidase, die das Fe^{2+} wieder zu Fe^{3+} oxidiert, während der Eisentransporter Ftr1p das gebildete Fe^{3+} in die Zelle transportiert. Fet3p benötigt Kupfer und Sauerstoff für seine Funktion, weshalb Cu-Defizienz oder Mutationen in den Kupfertransportergenen *CTR1*, *ATX1* oder *CCC2* zum Ausfall des hochaffinen Eisentransportes, und dadurch sekundär zu Fe-Mangelerscheinungen führen. Die Synthese aller beteiligten Proteine ist durch die Transkriptionsaktivatoren Aft1p und Mac1p reguliert, die den Eisen- und den Kupferzustand in der Zelle messen und in Mangelsituationen die Genexpression aktivieren. Außerdem werden Mn, Fe und andere Metalle durch Transporter der *Nramp*-Familie transportiert. Siderophorgebundenes Fe^{3+} kann durch das Sit1-Protein aufgenommen werden.

Der scheinbar widersinnige Mechanismus der Fe-Assimilation in Hefe: Reduktion des Eisens zu Fe^{2+} , dann die Oxidation zu Fe^{3+} und schließlich der Transport von Fe^{3+} in die Zelle, macht Sinn, wenn man bedenkt, daß freies Fe^{3+} in Lösung praktisch nicht vorkommt. Das lösliche Fe ist an Chelatoren unterschiedlichster Natur gebunden, so daß sich für den Transport eine Vielzahl an Substraten ergibt. Durch die zwischengeschaltete Reduktion werden die meisten Chelatkomplexe gespalten und es entsteht freies Fe^{2+} als einheitliches Substrat für den Oxidase-Permease-Komplex. Da Fe^{2+} durch seine Reaktivität mit Sauerstoff jedoch toxisch wirkt, muß es schnell wieder zu Fe^{3+} oxidiert werden. Dies geschieht in Hefe koordiniert mit dem Transport in die Zelle durch den Fet3p/Ftr1p-Komplex (EIDE 1998).

Zur Isolation des niedrigaffinen Fe-Transporters wurden *fet3*-Mutanten mit einer cDNA-Bank transformiert. Unter den Transformanten wurde nach schneller wachsenden Kolonien auf Fe-limitierendem Medium gesucht. Dabei wurde das *FET4*-Gen identifiziert, das für den niedrigaffinen Fe²⁺-Transporter aus Hefe codiert (DIX *et al.* 1994). Der niedrigaffine Fe-Transport war durch Cadmium und Cobalt, aber nicht durch Mangan, Zink und Strontium und nur leicht durch Nickel inhibierbar.

Schließlich wurde Fe²⁺-Transport in Hefe durch Proteine der *Natural resistance associated macrophage protein* (*Nramp*)-Familie nachgewiesen. Diese Proteine (Smf1-3p) transportieren jedoch eine Reihe von Übergangsmetallionen, insbesondere Mn²⁺. Der *Nramp*-vermittelte Fe-Transport scheint nur eine Nebenrolle zu spielen (EIDE 1998).

1.4 Ansätze zur molekularen Charakterisierung der Eisenassimilation in höheren Pflanzen

1.4.1 Komplementation von Hefemutanten mit pflanzlichen cDNAs

Hefen sind einzellige Eukaryonten, die sich genetisch und molekularbiologisch einfach handhaben lassen (ROSE *et al.* 1990). Sie eignen sich ausgezeichnet zur Überexpression pflanzlicher Proteine (MINET *et al.* 1992). Die Komplementation von Hefemutanten erwies sich als überaus erfolgreich zur Isolation sonst nur schwer zugänglicher pflanzlicher Membranprotein-cDNAs. Dabei wurden Kaliumtransportmutanten (SENTENAC *et al.* 1992), Aminosäuretransportmutanten (FROMMER *et al.* 1993) oder genetisch modifizierte Stämme (RIESMEIER *et al.* 1992) verwendet. Auch im Eisenstoffwechsel höherer Pflanzen konnte die Hefekomplementation erfolgreich angewandt werden: Der cDNA-Klon *IRT1*, der für einen Eisentransporter in *Arabidopsis thaliana* codiert, wurde durch Komplementation einer *fet3,fet4*-Doppelmutante isoliert (EIDE *et al.* 1996).

Die Komplementation der Fe-Reduktasemutanten (DANCIS *et al.* 1990, GEORGATSOU UND ALEXANDRAKI 1994) mit pflanzlichen cDNAs wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen angegangen, führte aber bislang nicht zum Erfolg (T. Altmann, N. Robinson, M.L. Guerinot, pers. Mitt; sowie eigene unveröffentlichte Daten). Ebenso konnte die Komplementation einer neuen eisenreduktase-defizienten Hefemutante (SJ22, JAKOBS 1994) mit einem 4,3 kb großen DNA-Fragment aus Hefe nicht zum weiteren Verständnis der Fe-Assimilation in Hefe beitragen (JAKOBS *et al.* 1995). Dieses DNA-Fragment wurde im Rahmen dieser Arbeit sequenziert. Es enthielt jedoch nur zwei recht kurze offene Leserahmen. Außerdem konnte die Komplementation der Mutante kaum reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

1.4.2 Differentielle Proteinmuster in Wurzeln

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurden Proteinmuster sowie die Muster *in vitro*-translatierter mRNAs eisensuffizienter und eisengehungelter Tomatenwurzeln verglichen. Es wurden einige differentiell exprimierte Polypeptide identifiziert, die aber offenbar nichts mit physiologisch relevanten Proteinen des Fe-Stoffwechsels zu tun hatten (HERBIK *et al.* 1996, SCHMIDT UND BUCKHOUT 1997).

1.4.3 Molekularbiologische Ansätze zur Identifizierung eisenmangel-induzierter Genprodukte

Durch differentielles *Screening* von cDNA-Banken sowie durch *Differential Display PCR* wurden RNAs eisengehungelter und eisensuffizienter Tomatenwurzeln miteinander sowie die RNAs der nicotianamin-auxotrophen Mutante *chloronerva* mit Wildtyp-RNAs verglichen. Dabei konnten einige unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert werden. Diese Gene hatten offenbar größere Relevanz in der allgemeinen Stress-Situation der Pflanzen als in der Eisenassimilation (GIRITCH *et al.* 1997). Das differentielle *Screening* einer Gerstenwurzel-cDNA-Bank führte zur Identifizierung von Genprodukten, die an der Phytosiderophor-Biosynthese beteiligt sind (NAKANISHI *et al.* 1993, OKUMURA *et al.* 1991, OKUMURA *et al.* 1994).

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Grundlage unserer molekularen Kenntnisse des Fe-Transportes höherer Pflanzen bilden die mikrobiologischen Vorarbeiten in Hefe. 1994 waren Komponenten des hochaffinen (*FET3*) und des niedrigaffinen Fe-Transportsystems (*FET4*) aus *Saccharomyces cerevisiae* auf molekularer Ebene bekannt (DANCIS *et al.* 1994A, DIX *et al.* 1994). Die Konstruktion der Hefemutante DEY1453, die in beiden Fe-Transportsystemen defizient ist, erlaubte die Isolierung und Charakterisierung des ersten Fe-Transporters (IRT1) aus *Arabidopsis thaliana* durch Hefekomplementation (EIDE *et al.* 1996). Mit der Isolierung der *IRT1*-cDNA war der Weg frei, Fe-Transporter-cDNAs aus Ertragspflanzen zu isolieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Eisentransporter-cDNAs aus Tomaten auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Dazu mußte zunächst eine cDNA-Bank aus den Wurzeln Fe-defizienter Tomatenpflanzen erstellt werden. Weiterhin sollte ein Hefestamm konstruiert werden, der die funktionelle Charakterisierung der aus dieser Bank isolierten Klone zuläßt. Schließlich sollten die Genprodukte der isolierten cDNAs in Hefe in Bezug auf das Wachstum und den Eisentransport physiologisch charakterisiert werden. Expressionsanalysen und Charakterisierungen der entsprechenden Gene sollten durchgeführt werden.

In Bezug auf die Fe^{3+} -Chelatreduktase konnte weder die Hefekomplementation noch differentielle *Screening*-Methoden zum besseren Verständnis der Fe-Assimilation höherer Pflanzen beitragen. Daher war es notwendig, einen neuen Modellorganismus zur Untersuchung der Eisenassimilation zu etablieren. Dafür wurde die einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* ausgewählt. Ihre Eisenassimilation sollte physiologisch charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzen, Stämme und Vektoren

Tomaten (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)		
Cultivar „Rutgers“		MEYER’S SEED CO, Baltimore, MD
Ackerschmalwand (<i>Arabidopsis thaliana</i>)		
Öcotyp „Landsberg erecta“		Samen erhalten von Dr. Thomas
Öcotyp „Columbia“		Altmann, IGF-Berlin
Algen (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)		
11-32b	mt-	Sammlung von Algenkulturen, Göttingen
11-32c	mt+	
83.81	mt-, cw15	<i>Chlamydomonas</i> Genetic Center, Durham, NC
CC-980	mt+, F50	
Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
S288C	<i>MATa leu2 ura3</i>	GEORGATSOU UND ALEXANDRAKI 1994
AMY43	<i>MATa ura3 Δfir1::LEU2</i>	diese Arbeit
DEY1453	<i>MATα trp1 ura3 Δfet3::LEU2 Δfet4::HIS3</i>	EIDE <i>et al.</i> 1996
SLY8	<i>MATa ade2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 smf1::HIS3</i>	KORSHUNOVA <i>et al.</i> 1999
ZHY3	<i>MATa ade6 can1 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 zrt1::LEU2 zrt2::HIS3</i>	ZHAO UND EIDE 1996B
64p	<i>MATa gcn4 his3 trp1 ura3 Δctr1::LEU2</i>	DANCIS <i>et al.</i> 1994B
Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)		
DH5α	Standard-Propagation von Plasmiden	HANAHAN 1983
Y1090 _(ZL)	Wirtstamm für λ _{ZipLox} -Phagen	GIBCO
DH10B _(Zip)	<i>In vivo</i> -Exzision von λ _{ZipLox} -Phagen	GIBCO
cDNA-Banken		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	im Hefe-Expressionsvektor pFL61	MINET <i>et al.</i> 1992
Tomaten	im Phagenvektor Lambda _{ZipLox} (GIBCO)	ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998
Plasmide und Vektoren		
PBluescript	Amp ^r	STRATAGENE, Heidelberg
pFL61	Amp ^r , URA3, 2 μm, PGK-P, PGK-T	MINET <i>et al.</i> 1992
pUC57-T	Amp ^r	MBI-FERMENTAS, Litauen
pUE1 und pUE2	Amp ^r , URA3, 2 μm, PGK-P, PGK-T	diese Arbeit
YDpL	Amp ^r , LEU2	BERBEN <i>et al.</i> 1991

2.1.2 Geräte

Die in einem molekularbiologischen Labor übliche Grundausstattung stand mir zur Verfügung.

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

AMERSHAM: Hybond-Membranen, Röntgenfilme, alk. Phosphatase; APPLICHEM: Phenol, Tris, verschiedene Feinchemikalien; BIOZYM: Agarose, Pipettenspitzen, „Easy Pure“ Gelextraktions-Kit; DIFCO: Bacto Agar, Bacto Peptone, Bacto Tryptone, Yeast Nitrogen Base, NZ-Amin; FLUKA: Isoamylalkohol, DPI, FCCP, CTAB, Sarcosyl; GIBCO: „SuperscriptII“ Reverse Transkriptase, DNase I (Amplification Grade), Restriktionsenzyme *NotI*, *SalI*, *ClaI*, Taq-Polymerase, „Superscript-Lambda-System“-cDNA-Synthesekit, Phagenarme λ_{ZipLox} ; MBI FERMENTAS: Restriktionsenzyme, Taq-Polymerase, T4-Ligase, T4-Kinase, dNTPs, Klenow-Fragment der DNA-PolymeraseI, Random Primed Labelling Kit; MERCK: Chloroform, Dichlordimethylsilan, verschiedene Feinchemikalien; PHARMACIA: T7-Sequencing-Kit, Sephadex G50 (fine), GFX-Gelextraktions-Kit; QIAGEN: Qiaspin, Qiagen Tip100, Plasmidpräparations-Kits; ROTH: Phenol, Chloroform, Acrylamidlösung, Ethanol (abs.), Glycin, SDS; SERVA: Ampicillin, Kanamycin, Tris, Harnstoff; SIGMA: diverse Feinchemikalien, BSA, GAM-AP (sek. Antikörper); STRATAGENE: Pfu-DNA-Polymerase, GigapackIII-Phagenverpackungsextrakte.

2.1.4 Radiochemikalien

AMERSHAM: $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP (1000 Ci/mmol), $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol), $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (3000 Ci/mmol); NEN: $^{55}\text{FeCl}_3$ (300 Ci/mmol), $^{59}\text{FeCl}_3$ (3000 Ci/g).

2.1.5 Synthetische Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden von TIB MOLBIOL, GIBCO oder NAPS synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
FTR1	TAGCAGAGTC GACAACCTCA CTTAAGGC
FTR2	CGAGCACCGT CGACGCAGTA AGAAGG
gIRT1-1	TCATATTTTG TAAAATCCAG ATAGGATAGG
gIRT2 -1	AAGAAATTCT ATCACTCTAT AGCTGTTGG
gIRT3-1	ATTATAATGT ATCATGATGT TGAAACGAAA GC
gIRT3-2	TTAGTATTGA GCTTACCTAA TTAGTTCGAG G
IRT1	CGAATTCAGC ACTTCTCATG AAAACAATCT TCC
IRT2	CCACATGATT TGAATTCCGC AATATCTGGA G
IRT1-m	TGGCTGTGGC TGGAAATCAT GTTC
IRT1-mr	ATGGGAATGA ACATGATTTT CAGCCACAG
IRT2-m	AATCCAGAAA CTGGTGGTGC TG
IRT2-mr	TGCACCCATT TCTTGATCAG CACCACCAGT
IRT-3'	AACTACAAAT TAAGTCTTAC ATGGC TG
IRT-5'	GCTCCACAAT CTTCTACTAC TGAT

IRT13	AGAATTTTTT TGCAACTCCC AATAGGT
IRT13-r	TCTTTTATCT TCATGACCTA TTGGGAG
IRT15	AACATATTCT TATACTAAAA AAATTCTTC
IRT15-r	ATTGTGCAAT TGTGAAGAAT TTTTTTAGTA
IRT23	GAAAAGTATA CACGATTACA ATTTTCC
IRT23-r	CCTTTATTGA ATTGCAAAAT TGTAATCG
IRT25	ACATTCCTAC TCAAAATTCA AAAACCTCT
IRT25-r	TGCAAATGTA GAGGTTTTTG AATTTTGAG
T ₁₈ -Pac	AGTACTTAAT TAAGCGGCCG CTTTTTTTTT TTTTTTTTTV
Tir-ME	CGATGGCTAT TGACTCTATA GC
Tir-EM	ATGCTATCCC AAGTGCTATA CCA
To-ACT1	AAGAGYTAYG ARYTNCWGA TGG
To-ACT2	TTRATCTTCA TGCTRCTWGG AGC

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Tomatenpflanzen

Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. „Rutgers“) wurden auf feuchtem Filterpapier ausgesät. Sie wurden vier Tage nach dem Keimen auf Vermiculit[®] mit 1/2-fach konzentrierter Hoagland-Lösung (EPSTEIN 1972) bei einem Licht-Dunkel-Rythmus von 14h/10h und 60 % rel. Luftfeuchtigkeit in Klimakammern vorgezogen und nach einer Woche in Flüssigkultur in Hoagland-Lösung herangezogen. Für Eisenmangelversuche wurden sie in eisenfreie Nährlösung überführt, die alle drei Tage gewechselt wurde. Nach vier bis fünf Tagen waren Eisenmangelsymptome erkennbar.

2.2.2 Anzucht der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*

Alle Methoden wurden in Anlehnung an das Standardwerk von HARRIS 1988 durchgeführt. Die Algen wurden mixotroph in TAP-Medium herangezogen. Auf Platten wurde dem TAP-Medium 0,3 % Yeast Extract zugesetzt. Für Eisen- und Kupfermangelversuche wurden die darin enthaltenen Spurenelemente ohne Fe oder ohne Cu eingesetzt..

2.2.3 Eisenchelat-Reduktasetest in *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Reduktasetests wurden beschrieben (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998).

2.2.4 Kupferreduktasetest in *Chlamydomonas reinhardtii*

Die extrazelluläre Reduktion von Cu²⁺ wurde nach ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998 gemessen.

2.2.5 Messung der Eisenaufnahme in *Chlamydomonas reinhardtii*

Die Eisentransportmessungen wurden bei ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998 beschrieben.

2.2.6 RNA-Isolation aus Pflanzen und Northern-Blot-Analyse

Pflanzliche Gesamt-RNA wurde nach LOGEMANN *et al.* 1987 isoliert. Für Northern Blot-Analysen wurden je 30 µg Gesamt-RNA über formaldehydhaltige Agarosegele (LEHRACH *et al.* 1977) aufgetrennt, auf Nylonmembranen überführt und nach einer einstündigen Prähybridisierung in NSEB (125 mM Na-Phosphat, 7 % SDS, 5 mM EDTA, 1 % BSA, pH 7,2) über Nacht bei 65°C mit genspezifischen Sonden (FEINBERG UND VOGELSTEIN 1983) hybridisiert. Die Membranen wurden stringent gewaschen (2 x 15 min, 2-fach SSC, 0,2 % SDS bei 50°C sowie 1 x 15 min mit 0,2-fach SSC, 0,2 % SDS). Ein Röntgenfilm wurde bei -80°C auf den Membranen exponiert.

2.2.7 DNA-Isolation aus Pflanzen und Southern Blot-Analyse

Pflanzliche DNA wurde nach ROGERS UND BENDICH 1985 isoliert. Southern Blot-Analysen wurden nach SAMBROOK *et al.* 1989 durchgeführt. Die Sonden wurden mit dem „Renaissance“-System von NEN nicht-radioaktiv markiert und mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten anti-Fluorescein-Antikörpers durch eine Chemilumineszenz-Reaktion detektiert.

2.2.8 PCR-Amplifikation von DNA mit spezifischen Primern

Zur PCR-Amplifikation wurden 0,01 - 0,1 µg DNA-Templat mit 20 nM Primer, 200 nM dNTPs, 1,5 - 2,5 mM MgCl₂, 1 - 3 U Taq-Polymerase, PCR-Puffer nach Herstellerangaben (GIBCO) in einem Volumen von 30 - 100 µl eingesetzt. Nach 4 Minuten Denaturierung bei 94 °C wurden 28 - 38 Zyklen von 30 s Denaturierung bei 94°C, 45 s Annealing bei 48-60°C und 60-90 s Polymerisation bei 72°C durchlaufen. Anschließend wurde die Polymerisation 5 Minuten lang bei 72°C fortgesetzt und die Ansätze wurden auf 4°C gekühlt. 10 µl der PCR-Ansätze wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt. Der Rest wurde aufgereinigt und in den Vektor pUC57-T (MBI) ligiert.

2.2.9 RT-PCR

2 µg Gesamt-RNA wurde für 5 Minuten bei 68°C denaturiert, mit 20 pmol Oligo(dT)-Primer, 20 µM dNTPs, 2 mM DTT, 1xErststrangpuffer (GIBCO), 0,2 u/µl RNase-Inhibitor (MBI) und 10 u/µl Superscript(II)-Reverse Transkriptase (GIBCO) in einem Gesamtvolumen von 20 µl bei 37-45°C revers transkribiert. 1-2 µl des RT-Ansatzes wurden als Templat in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.10 Konstruktion von cDNA-Banken

Polyadenylierte mRNA wurde aus Gesamt-RNA mit dem PolyA-Spin[®] Kit von NEB angereichert. 4-5 µg mRNA wurden mit Hilfe des Superscript-Lambda-Systems (GIBCO) nach Herstellerangaben in doppelsträngige cDNA überführt. Nach Addition von Linkern, Restriktionsspaltung und Größenselektion über Gelfiltrationssäulen wurden die Fraktionen mit

den größten cDNAs in den Phagenvektor Lambda_{ZipLox} ligiert. Das Ligationsgemisch wurde mit Hilfe des Gigapack III-Verpackungsextraktes (STRATAGENE) in Phagenpartikel verpackt und geeignete Wirtszellen wurden mit den Phagen infiziert.

2.2.11 Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA

Die Sequenzierungen wurden nach der Didesoxymethode (SANGER *et al.* 1977) mit Hilfe des T7-Sequencing Kits (PHARMACIA) mit $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP durchgeführt. Außerdem konnte der Sequenzierservice der Arbeitsgruppe für Genetik (Biologie, HU-Berlin) genutzt werden.

2.2.12 Computergestützte Analyse der DNA-Sequenzen

Die NCBI-Server: BLAST und ENTREZ wurden benutzt, um eigene Sequenzen mit der GenBank[®] und der Swissprot[®]-Datenbank zu vergleichen oder um Sequenzen zu importieren. Die erhaltenen Sequenzen wurden auf einem IBM-kompatiblen PC mit Hilfe des BLUEGENE[®]-Programmes (MAGICWORKS, Teltow) analysiert. Sequenzalignments wurden mit dem ClustalW-Algorithmus (THOMPSON *et al.* 1994) durchgeführt und mit Hilfe des GeneDoc-Programmes (www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml) dargestellt. Das SignalP- (NIELSEN *et al.* 1997) und das TopPredII-Programm (CLAROS UND V. HEIJNE 1994) wurden *online* benutzt.

2.2.13 Sonstige molekularbiologische Methoden

Alle anderen molekularbiologischen Methoden wurden nach SAMBROOK *et al.* 1989 durchgeführt.

2.2.14 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefezellen wurden nach der Methode von DOHMEN *et al.* 1991 transformiert.

2.2.15 Präparation von Plasmid- und genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

10-ml-Kulturen wurden in Voll- oder Selektivmedium bis zur stationären Wachstumsphase herangezogen und durch Zentrifugation geerntet. Nach 30-minütigem Zellwandabbau durch Lyticase in SCE-Puffer (0,9 M Sorbit, 50 mM Na-Citrat, 10 mM EDTA, 0,1 % β ME) wurden die Hefen in Lysispuffer (2 % Triton-X100, 1 % SDS, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8) mit Glaskügelchen (\varnothing 0,5 mm) in Gegenwart von Phenol/Chloroform fünf Minuten lang geschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, die Nucleinsäuren wurden ethanolpräzipitiert, in TE-RNase gelöst, nach 20 min bei 37 °C erneut mit Chloroform extrahiert und präzipitiert. Die gewaschenen Sedimente wurden in 50 μ l TE gelöst. Fünf μ l davon wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen, 15 μ l für Restriktionsspaltungen für Southern-Blots und 0,5 μ l als Templat in analytische PCR-Reaktionen eingesetzt. Die aus *E. coli* isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse oder PCR identifiziert.

2.2.16 Eisenchelate-Reduktasetest in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Eisenreduktase in Hefe wurde zunächst mit einem Filtertest (DANCIS *et al.* 1990) detektiert.

Dieser Test wurde später durch die eindeutigere Nitroprussid-Methode von LESUISSE *et al.* 1995 ersetzt. Quantitativ wurde die Eisenreduktase durch eine Modifikation der Methode von DANCIS *et al.* 1990 bestimmt.

2.2.17 Messung der Eisenaufnahme in *Saccharomyces cerevisiae*

Fe-Transportmessungen wurden bei ECKHARDT *et al.* 2000 beschrieben.

2.2.18 Sonstige hefegenetische Methoden

Alle anderen hefegenetischen Arbeiten wurden nach dem Standardwerk von ROSE *et al.* 1990 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Konzept zur Isolierung von Fe-Transporter-cDNA-Klonen aus Tomaten

Die Ähnlichkeit der Fe-Transportergene zwischen verschiedenen Spezies höherer Pflanzen sollte hoch genug sein, um die entsprechenden Sequenzen durch heterologe Hybridisierung identifizieren zu können. Das Konzept zur Isolierung von Fe-Transporter-cDNA-Klonen aus Tomaten umfaßt die Isolierung der *IRT1*-cDNA durch RT-PCR aus der RNA eisengehungelter *Arabidopsis*-Wurzeln, die Konstruktion einer cDNA-Bank aus eisengehungerten Tomatenwurzeln und das *Screening* dieser Bank mit der *IRT1*-cDNA als Sonde. Zur funktionellen Charakterisierung der cDNAs war die Konstruktion einer eisentransportdefizienten Hefemutante notwendig.

3.2 Konstruktion neuer Hefe-Expressionsvektoren

Das Plasmid pFL61, welches das Rückgrat für die Hefe-Expressions-cDNA-Bank aus *Arabidopsis* bildet (MINET *et al.* 1992), zeichnet sich durch ausgezeichnete Expressionseigenschaften in Hefe aus. Es enthält den Phosphoglyceratkinase (PGK)-Promotor sowie das 3'-Ende des PGK-Gens. Dieses Plasmid enthält jedoch nur eine einzige Schnittstelle (*NotI*) zur Insertion fremder DNA. Darum erschien es sinnvoll, das Plasmid durch Addition mehrerer singulärer Schnittstellen zu erweitern.

Der größte Teil des ursprünglich vorhandenen pUC-Polylinkers in pFL61 wurde durch Verdau mit *SmaI* und *PvuII* deletiert. In die *NotI*-Schnittstelle wurde das 79 bp große *NotI*-*Bsp120I* Fragment des pBluescript-Polylinkers inseriert. Durch die zwei möglichen Orientierungen ergaben sich die Plasmide pUE1 und pUE2. Sie unterscheiden sich durch die Orientierung des Polylinkers (Abb. 7).

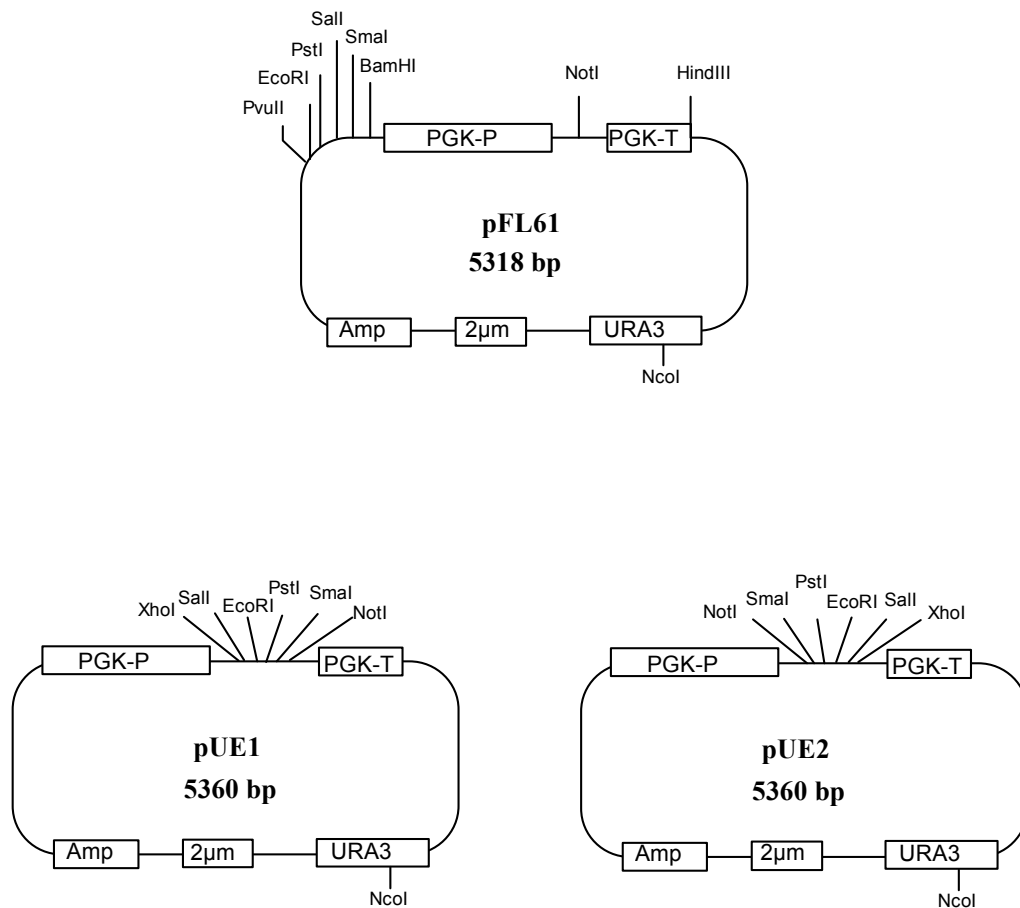


Abb. 7: Schematische Restriktionskarten der Hefe-Expressionsplasmide pUE1 und pUE2. Nur singuläre Schnittstellen sind aufgeführt. Die Karten sind nicht maßstabsgetreu. PGK-P: Phosphoglyceratkinase-Promotor, PGK-T: Phosphoglyceratkinase-Terminator, 2µm: Replikationsursprung des in *S. cerevisiae* natürlich vorkommenden 2µm-Plasmides, Amp: β-Lactamasegen.

3.3 Konstruktion einer Fe-Transport-defizienten Hefemutante

3.3.1 Deletion des *FTR1*-Gens im Hefestamm S288C

Das *FTR1*-Gen codiert für eine Komponente des hochaffinen Fe-Aufnahmesystems in Hefe (STEARMAN *et al.* 1996). Ein 1894 bp großes Fragment des *FTR1*-Gens wurde durch PCR mit den Primern FTR1 und FTR2 aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert und mit *SalI*-Schnittstellen versehen. Dieses Fragment wurde zunächst in den Vektor pUC57-T ligiert und anschließend in das Plasmid pSKΔPst, einem Derivat von pBluescriptSK⁺, dem die *SmaI*-, die *EcoRI*-, die *PstI* und die *EcoRV*-Schnittstellen fehlen, subkloniert. Das *LEU2*-Gen aus Hefe wurde vom Plasmid YDpL mit *SmaI* und *PstI* befreit und in das mit *PstI* und *EcoRV* gespaltene und dephosphorylierte *FTR1*-haltige Plasmid ligiert (Abb. 8A).

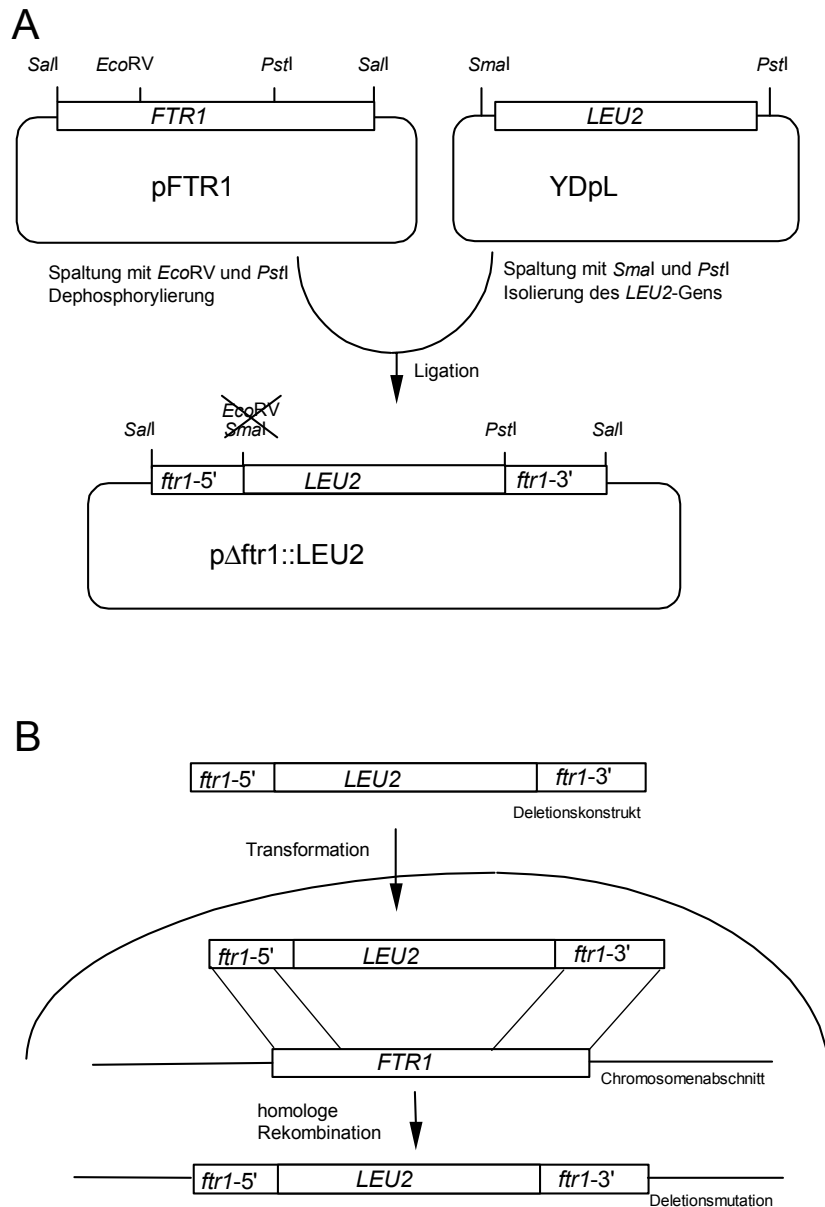


Abb. 8: A: Schema der Konstruktion einer „one step gene disruption“-Kassette zur Deletion des *FTR1*-Gens aus *S. cerevisiae*. B: Schema der Deletion des *FTR1*-Gens durch homologe Rekombination.

Das Insert des resultierenden Plasmides pΔ*ftr1*::*LEU2* wurde durch PCR amplifiziert und kompetente Zellen des Hefestammes S288C wurden mit dem Deletionsfragment transformiert (Abb. 8B). Die Transformanten wurden durch ihre Fähigkeit zum Wachstum auf leucinfreiem Medium selektiert. In vier von 12 untersuchten, leucinprototrophen Kolonien konnte das Deletionskonstrukt durch PCR und Southern-Blot-Analysen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt; MAS MARQUES 1998).

3.3.2 Wachstum der putativen *?ftr1*-Mutanten auf eisenlimitiertem Medium

Kolonien der Stämme AMY42, AMY43 und AMY44 waren nicht in der Lage, auf YPD-Medium mit 200 μM des Fe^{2+} -spezifischen Chelators BPDS zu wachsen, während der Wildtypstamm S288C unter diesen Bedingungen gut wachsen konnte (Abb. 9).

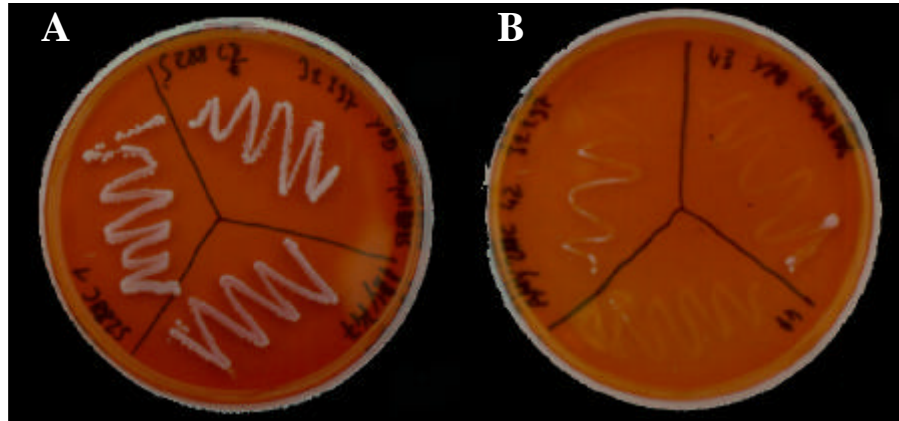


Abb. 9: Wachstum der mit einem *?ftr1::LEU2*-Deletionskonstrukt transformierten Hefekolonien, sowie ihres Elternstammes auf BPDS-haltigem YPD-Medium. A: Wildtypstämme S288C und DBY747. B: Leucin-prototrophe Transformanten AMY 42, AMY43 und AMY44 (mit Genehmigung von Andreas Mas Marques).

Der Stamm AMY43 wurde für die nachfolgenden Analysen ausgewählt (MAS MARQUES 1998).

3.3.3 Messung der Fe-Transports im Stamm AMY43

Um die Deletion des *FTR1*-Gens phänotypisch zu untersuchen, wurde der direkte Transport radioaktiv markierten Eisens gemessen. Dazu wurde zunächst ein Testsystem, modifiziert nach EIDE *et al.* 1992, etabliert: In Vorversuchen wurden die Substratkonzentration, die Länge der Messung, die Zellzahl, der Einfluß verschiedener Filtermaterialien sowie verschiedene Pufferbedingungen variiert. Die daraus resultierenden Testbedingungen sind im Methodenteil (2.2.17) sowie bei ECKHARDT *et al.* 2000 beschrieben.

Um die Deletion einer Komponente des hochaffinen Fe-Transportsystems in Hefe nachzuweisen, wurde Fe^{2+} für die Aufnahmemessungen in einer Konzentration von 2 μM angeboten. Unter diesen Bedingungen sollte der niedrigaffine Fe-Transport kaum aktiv sein (DIX *et al.* 1994). Der Stamm AMY43 zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen mit 0,02 pmol/min/ 10^6 Zellen sehr geringe Fe-Aufnahme im Vergleich zu seinem Wildtyp S288C (1,88 pmol/min/ 10^6 Zellen; Abb. 10; MAS MARQUES 1998).

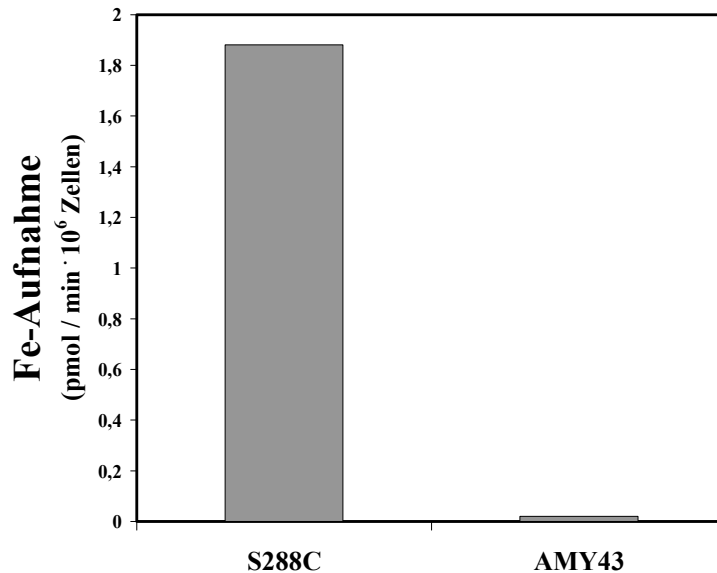


Abb. 10: Vergleich der Fe-Aufnahme der Hefestämme S288C und AMY43. Die Zellen wurden über Nacht auf Fe-limitierendem Medium herangezogen, gewaschen und zwei Stunden lang auf Eis gehalten. Die Zellen wurden bei 30°C mit 2 μ M radioaktiv markiertem Fe^{2+} in Gegenwart von Ascorbat inkubiert. Nach 20 sec., 3, 6, 9 und 12 min wurden Aliquots der Zellsuspension in eiskalte Quenchlösung pipettiert, die Lösung wurde über Glasfaserfilter abgesaugt, die Zellen wurden mit Quenchlösung gewaschen und die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wurde gemessen. Kontrollwerte auf Eis wurden von den Meßwerten bei 30°C abgezogen (n = 2; mit Genehmigung von Andreas Mas Marques).

3.4 Konstruktion einer Tomatenwurzel-cDNA-Bank

Zwei Wochen alte Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* Mill., cv. Rutgers) wurden in Hydrokultur fünf Tage lang eisenfrei herangezogen. Die RNA ihrer Wurzeln wurde isoliert und polyadenylierte mRNA wurde durch zweimalige Chromatographie über oligo(dT)-Cellulose angereichert. Eine cDNA-Bank wurde aus dieser mRNA mit Hilfe des Superscript Lambda Systems in dem Phagenvektor Lambda_{ZipLox} konstruiert und *in vitro* in Phagenpartikel verpackt.

Die primäre Bank wurde titriert, sie umfaßte über 6 Millionen plaque-bildende Bakteriophagen. Durch Ausplattieren auf X-Gal/IPTG-haltigem Medium wurde der Anteil rekombinanter Phagen geschätzt: er lag bei über 99 %. Die Analyse 24 zufällig ausgewählter Klone wurde für die Bestimmung der mittleren Insertgröße herangezogen. Alle Klone enthielten Inserts, deren Größe zwischen 0,5 und 2,0 kb lag. Die mittlere Insertgröße lag bei etwa 1,25 kb (Abb. 11).

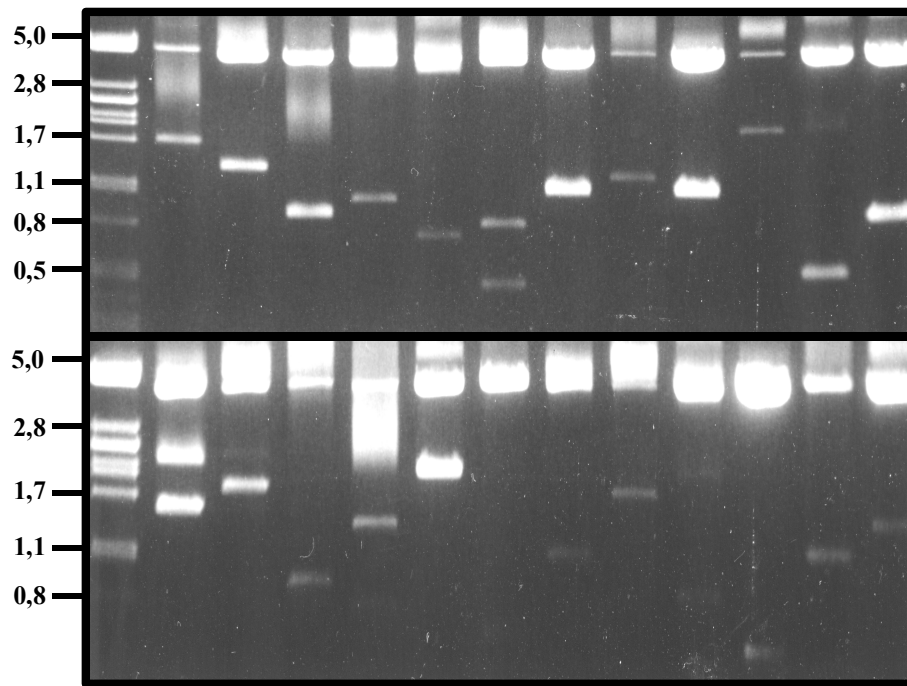


Abb. 11: Bestimmung der mittleren Insertgröße der Tomatenwurzel-cDNA-Bank. 24 Kolonien einer *in vivo*-Exzision der Bank wurden in Flüssigkultur herangezogen. Ihre Plasmid-DNA wurde mit *Mlu*I gespalten. Die Bande bei 4,1 kb entspricht der Vektor-DNA. Als Größenstandard wurde *Pst*I-gespaltene Lambda-DNA verwendet. Die Größen der Markerbanden in kb sind links angegeben.

3.5 Screening der Tomatenwurzel-cDNA-Bank mit der *IRT1*-cDNA aus *Arabidopsis thaliana*

Ein 1074 bp großes cDNA-Fragment von *IRT1* (EIDE *et al.* 1996) wurde durch RT-PCR mit Hilfe der Primer IRT1 und IRT2 aus der Wurzel-RNA eisengehungerter *Arabidopsis*-Pflanzen amplifiziert. Es wurde kloniert und durch Restriktionsanalyse sowie partielle Sequenzanalyse identifiziert.

Etwa 200.000 Phagenplaques der Tomatenwurzel-cDNA-Bank wurden durch Hybridisierung mit dem *IRT1*-cDNA-Fragment aus *Arabidopsis thaliana* durchmustert. Dabei konnten elf hybridisierende Plaques isoliert werden. Die Phagen wurden *in vivo* exzidiert und je 2 Kolonien wurden zur Plasmidpräparation herangezogen. Die Plasmide wurden zunächst durch Restriktionsanalysen analysiert. Anhand der Restriktionsmuster ließen sich zwei Klassen von Klonen finden, die sich durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit einer *Bam*HI-Schnittstelle unterschieden. Allerdings waren die Restriktionsmuster der aus einem Phagenplaque hervorgegangenen Plasmide nicht in allen Fällen gleich, so daß die Identifizierung der putativen Eisentransporterklone durch partielle Sequenzanalyse sowie durch funktionelle Komplementation einer Hefemutante vorgezogen wurde.

3.6 Isolierung putativer Fe-Transporter-cDNAs aus Tomatenwurzeln

Aufgrund der partiellen Sequenzanalyse der 22 Plasmide ließen sich fünf unterschiedliche Sequenztypen unterscheiden, von denen zwei Ähnlichkeiten zu IRT1 aufwiesen (Sequenztypen I und II), während drei Plasmide weder zueinander noch zu IRT1 Sequenzähnlichkeiten aufwiesen (Sequenztypen III bis V, MAS MARQUES 1998). Letztere wurden nicht weiter analysiert.

Die cDNA-Inserts der Sequenztypen I und II wurden durch Restriktion mit *NotI* und *SalI* aus ihrem Plasmid befreit und in den ebenfalls mit *SalI* und *NotI* gespaltenen und dephosphorylierten Hefe-Expressionsvektor pUE1 ligiert. Kompetente Zellen der Hefestämme AMY43 und DEY1453 wurden mit den Ligationsgemischen transformiert. Einzelne uracilprototrophe Kolonien wurden auf Fe-limitierendem Medium ausgestrichen. Dieselben Kolonien wurden zur Plasmidpräparation herangezogen. Es zeigte sich, daß alle Kolonien, die auf Fe-limitierendem Medium wachsen konnten, Plasmide mit den cDNA-Inserts enthielten, während die Kolonien, die unter gleichen Bedingungen nicht wuchsen, religierte „leere“ Plasmide enthielten (MAS MARQUES 1998).

Die cDNAs, die den Hefemutanten die Fähigkeit zum Wachstum auf Fe-limitierendem Medium verliehen hatten (Abb. 16), wiesen deutliche Homologien zu *IRT1* aus *Arabidopsis* auf. Daher wurden sie als „*Lycopersicon esculentum* iron-regulated transporter“ (*LeIRT1* und *LeIRT2*) bezeichnet.

3.6.1 Sequenzanalyse der putativen Fe-Transporter-cDNAs aus Tomaten

Die cDNA-Inserts der aus Hefe isolierten Plasmide wurden vollständig und doppelsträngig sequenziert und ihre Sequenzen wurden in der GenBank™ unter den Accessionnummern AF136579 und AF136580 veröffentlicht. Beide cDNAs enthalten lange offene Leserahmen, die für ein 350 Aminosäuren (AS, *LeIRT1*, Abb. 12) bzw. für ein 352 AS langes Polypeptid (*LeIRT2*, Abb. 13) codiert.

caaccacaaacaacaacaaaaacatatattcttataactaaaaaattcttcacaattgcac	60
M A N Y N F K Y I A I F L L L I S I L A	20
aatggcaaattataattttcaagtacatcgccattttctccttctcatctcaattttggc	120
P R V L S V V E D C G A E E D N S C V N	40
ccctcgagtactatcagtagtagaagattgtggagcagaagaagacaactcatgtgtcaa	180
K S K A L P L K I I A I V S I L I T S M	60
taaatccaaagcgttacccttaaaaatcatagccatagctcccatccttatcactagtat	240
I G V C L P L V T R S I P A L S P E R N	80
gatcggagtagtgtcttcactagtcacacgttctattccggccctaagcccggaaagaaa	300
L F V I V K A F A A G I I L A T G F M H	100
cctttttgtgatagtttaaggcattttgctgctggaattatcctggctacggggtttatgca	360
V L P D S F D M L S S S c L K E H P W H	120
cgtgctaccggactcgtttgacatgttgtcatcgagttgccttaaggagcaccctgtggca	420
K F P F T G F V A M L S A I V T M A I D	140
caaattccccctttactggattttgtggcaatgttgtccgctatagtaacgatggctattga	480
S I A T S L Y S K K H N G G V V N P E G	160
ctctatagctactagttttatacagcaaaaagcataatgggtgggtgtggtaatccagaagg	540
D Q E M A V A G N H V H S H H H G S L	180
tgatcaagaaatggctgtggctggaaatcatgttcattcccacatcatcatcatggatccct	600
S T K D G L D G K K L L R Y R V I A M V	200
ttcgactaaagatggacttgatggcaaaaaattactaagatacagagtaattgccatggt	660
L E L G I I V H S I V I G L S L G A S S	220
gttagagcttggaattattgttccactccatagtgattgggctatcactagggtgcgtcaag	720
N T C T I K G L V A A L C F H Q M F E G	240
caatacatgtacgattaaaggactcgtagctgcactttgctttcatcaaattgtttgaagg	780
M G L G G C I L Q A E Y K F M K K A I M	260
aatgggccttggtggttgcatcctacaggcggagtataagttcatgaagaaggctataat	840
A F F F A V T T P F G I A L G I A L S T	280
ggcgttttttcttcgcagtaacaacaccattttggtatagcacttgggatagcattgtcaac	900
T Y E E N S P R A L I T V G L L N A S S	300
tacttatgaggaaaatagtcacggcggttaataactgttggattactgaatgcatcatc	960
A G L L I Y M A L V D L L A A D F M G D	320
tgctggacttttgatatatataggcttttggtgatcttcttgctgctgattttatgggtga	1020
K L Q G S V K L Q I K S Y M A V L L G A	340
caaattacaaggcagtggtcaaactacaaattaagtcttacatggctgttcttcttggtgc	1080
G G M S V M A I W A	350
tggtggaatgtcagtcagtgccatttgggcttaaaacttgtcttcataattttgttttgagt	1140
aataagtgtggccttcttttatcttcacatgacatttgggagttgcaaaaaattctgtaa	1200
aatacatcatcttatgtaagtgtatccaatgagtaaaacttttccaactaaatattcttcc	1260
acaaattattaagaaaaaggaaaaagggtttgctaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1320
aa	1322

Abb. 12: cDNA- und daraus abgeleitete Peptidsequenz von *LeIRT1*. Die blauen Kästen repräsentieren putative TM-Domänen. Der rote Kasten stellt das putative Signalpeptid dar. Der Histidin-Cluster ist blau und unterstrichen.

	M S D Y	4
aaaaaaacacattcctactcaaaattcaaaaacctctacatttgcacaatgagtgattat		60
N F K H I A I I F I L I S I F I P R V L		24
aatttcaagcacatcgccatcatctttatttctcatatcaattttcatccctcgagtttta		120
S V V E D C G A Q E D N S C V N K S K A		44
tcagtagtagaagattgtggagcgcaagaagataactcatgtgtcaacaaatccaaagcg		180
L P L K I I A I V S I L I T S M I G V C		64
ttacccttaaaaatcatagccatagtcctcatccttatcactagtatgatcggagtttgt		240
L P L V T R S I P A L S P E R N L F V I		84
cttccactagtcacacgttctatcccggccctaagcccggaaagaaacctttttgtgata		300
V K A F A A G I I L A T G F M H V L P D		104
gtcaaggcatttggctgccggaattatattggctacggggtttatgcacgtgcttccctgac		360
S F D M L S S S C L K E N P W H K F P F		124
tcattcgacatgttgtcatcgagttgccttaaggagaatccatggcacaaattccccttc		420
T G F V A M L S A I V T M A I D S I A T		144
actggatttgttgcctatgttgtccgctatagttacaatggctattgactctatagcaact		480
S M Y S K K H R A G L V N P E T G G A D		164
agtatgtatagcaaaaaacatagagctggtttgggttaatccagaaactgggtggtgctgat		540
Q E M G A V N G G H S H H H G S L S T		184
caagaaatgggtgcagtaaattgggtggacattcacatcatcatcgatcactttccact		600
K D G V E G T K L L R Y R V I A M V L E		204
aaagacggagttgaaggcactaaattactacgatatagagtcacgcctatgggtgtagag		660
L G I I V H S I V I G I S L G A S N N T		224
ctgggaatcatagttcactcaatagtaataggaatttcacttggagcttcaacaataca		720
C T I K G L V A A L C F H Q M F E G M G		244
tgtacaattaaaggattagttgctgcactttgctttcatcaaattgtttgaaggaatggga		780
L G G C I L Q A E Y K F L K K T L M A F		264
cttgggtggttgcatctctccaggctgagtacaagtttttgaagaagacactaatggcattt		840
F F A V T T P F G I A L G M A L S T T Y		284
ttcttcgcagtaacaactccatttgggtatagcacttgggtatggcattgtcaactacttat		900
E E T S P R A L I T V G L L N A S S A G		304
gaggaaactagcccacgggcgttaataactgttggattactgaatgcatcatctgctggg		960
L L I Y M A L V D L L A A D F M G D K L		324
cttttgatttatatggccttgggtgatcttcttgctgctgattttatgggtgacaaatta		1020
Q G S V K L Q I K S Y M A V L L G A G G		344
caaggcagtgtaaactacaaattaagtcttacatggctgttcttttaggtgctggtgga		1080
M S L M A K W A		352
atgtctctcatggccaaatgggcctagctttgttttttcatatgagtctgtgaaataacct		1140
cctttattgaattgcaaaattgtaatcgtgtatacttttcaatttcgtgggttaaatttga		1200
actgctatgtatttccctc		1219

Abb. 13: cDNA- und daraus abgeleitete Peptidsequenz von *LeIRT2*.

Die aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Polypeptide sind stark hydrophob. Hydropathie-Analysen (KYTE UND DOOLITTLE 1982) wiesen auf 8 oder 9 putative Transmembran(TM)-Domänen hin (Abb. 14). Beide Polypeptide enthalten mehrere Histidinreste zwischen der 4. und der 5. hydrophoben Domäne. Analysen mit dem TopPred- und dem SignalP-Algorithmus ergaben, daß die histidinreichen Domänen (H170-H177, LeIRT1 und H174-H179, LeIRT2) auf der cytosolischen Membranseite lokalisiert sind und daß beide Polypeptide höchstwahrscheinlich N-terminale Signalsequenzen zur Integration ins Endoplasmatische Retikulum aufweisen. Ob diese Signalsequenzen proteolytisch entfernt werden, ist nicht bekannt. Die aus den Sequenzdaten abgeleiteten Eigenschaften der LeIRT-Polypeptide sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

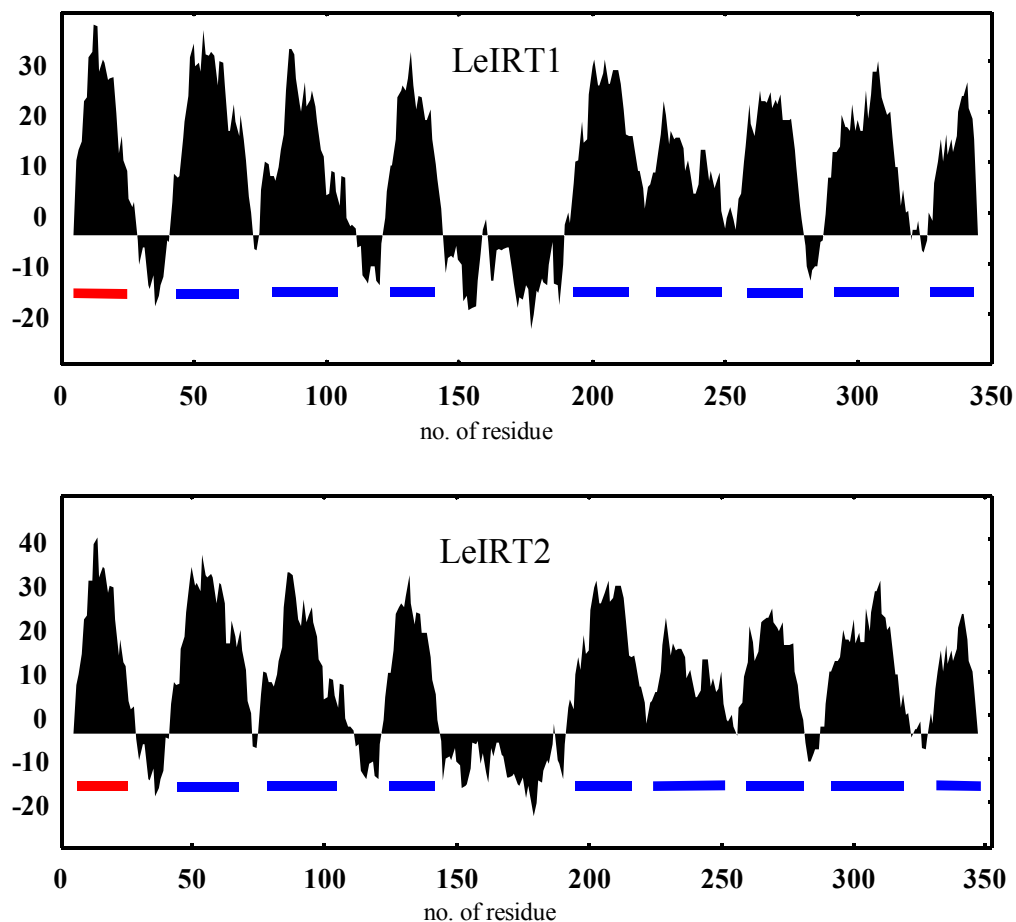


Abb. 14: Kyte/Doolittle-Hydropathieanalyse der LeIRT-Proteine bei einer Fenstergröße von 13 Aminosäuren. Rote Balken symbolisieren putative Signalsequenzen, blaue Balken stellen putative Transmembrandomänen dar.

Tabelle 2: Übersicht über die *LeIRT*-cDNAs und die daraus abgeleiteten Polypeptide. ORF-Analysen, Glycosylierungsstellen, Kyte/Doolittle-Hydropathie-Analysen, Berechnung des M_r und der P_i wurden mit dem Programm BlueGene™ der Firma MAGIC WORKS erstellt. Weiterhin wurden das TopPred™- und das SignalP™-Programm verwendet.

	Länge der cDNA	Länge des ORF	putative Signal- sequenz	putative N- Glyco- sylierungs- stellen	putative TM- Domänen	berechnetes M_r des unprozes- sierten Polypeptids	berechneter P_i des unprozes- sierten Polypeptids
LeIRT 1	1322 bp	350 AS	25 AS	N40, N297*	8 oder 9**	37,42 kDa	pH 9,40
LeIRT 2	1219 bp	352 AS	24 AS	N40, N222, N299*	8 oder 9**	37,63 kDa	pH 9,40

* Sequenz ist Teil einer hydrophoben Domäne, daher ist die Glycosylierung an dieser Stelle eher unwahrscheinlich.

** Falls die Signalsequenz nicht proteolytisch entfernt wird.

3.6.2 Ähnlichkeiten der LeIRT-Proteine mit bekannten Proteinen

Datenbankvergleiche mit Hilfe des Blastp-Algorithmus‘ legten Ähnlichkeiten der LeIRT-Proteine zu Eisen- und Zinktransportern aus *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, der Nematode *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sowie Mäusen und Menschen offen (Abb. 15). Diese Proteine gehören zur kürzlich definierten ZIP-Genfamilie (*ZRT-IRT-related proteins*, ENG *et al.* 1998). Die in dieser Proteinfamilie am stärksten konservierte Signatursequenz in der vierten TM-Domäne (ENG *et al.* 1998) „[LIVFA] [GAS] [LIVMD] [LIVSCG] [LIVFAS] [H] [SAN] [LIVFA] [LIVFMAT] [LIVDE] [G] [LIVF] [SAN] [LIVF] [GS]“ findet sich in beiden LeIRT-Sequenzen wieder (L203 - G217 in LeIRT1 sowie L205 - G219 in LeIRT2; Abb. 38), außerdem wurden konservierte Histidinreste in der zweiten, vierten und fünften TM-Domäne gefunden, die wahrscheinlich Teile amphipatischer Helices sind, und denen eine Rolle im Metallionentransport zugesprochen wurde (ENG *et al.* 1998). Die höchsten Ähnlichkeiten weisen die LeIRT-Proteine zueinander (89 % identische AS), zu RIT1 aus Erbsen und zu IRT1 aus *Arabidopsis* auf (Abb. 15; Tabelle 3). Die Sequenzen der putativen TM-Domänen sind besonders stark konserviert (Abb. 15).

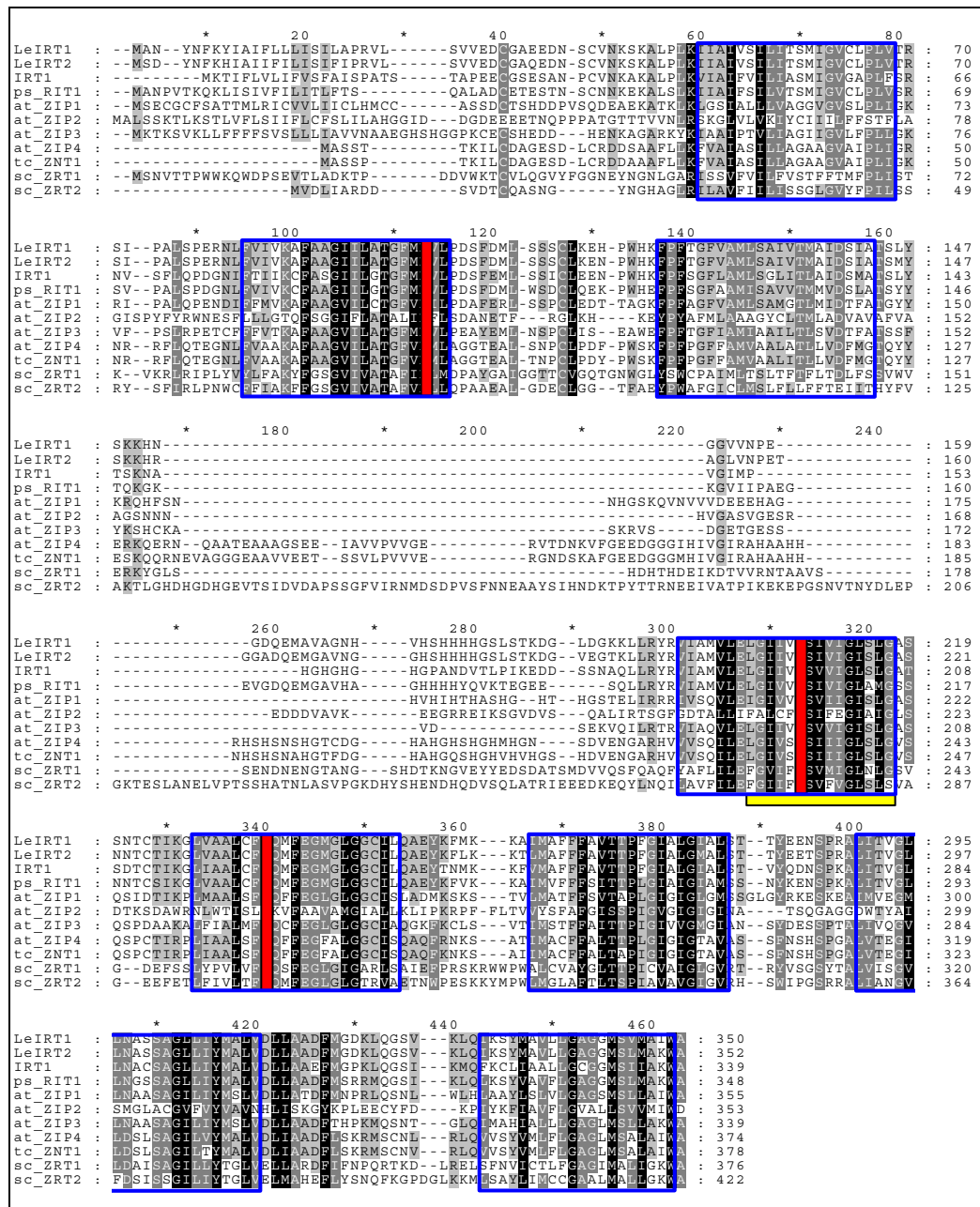


Abb. 15: ClustalW-Alignment der aus den cDNA-Sequenzen vorhergesagten LeIRT-Proteine mit verwandten Proteinen der ZIP-Familie aus Pflanzen und Hefe. Schwarze Bereiche symbolisieren identische Aminosäurereste, graue Bereiche sind konservative Substitutionen. Blaue Kästen bezeichnen TM-Domänen. Die ZIP-Signatursequenz ist durch einen gelben Balken markiert und die hochkonservierten Histidine sind rot gekennzeichnet (at, *Arabidopsis thaliana*; ps, *Pisum sativum*; tc, *Thlaspi caerulescens*; sc, *Saccharomyces cerevisiae*).

Tabelle 3: Verwandschaft der aus den Tomaten-cDNAs abgeleiteten Polypeptide mit bekannten Proteinen.

	<u>LeIRT1</u>		<u>LeIRT2</u>	
	identische Aminosäuren	ähnliche Aminosäuren	identische Aminosäuren	ähnliche Aminosäuren
IRT1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	63 %	77 %	62 %	77 %
RIT1 (<i>Pisum sativum</i>)	67 %	81 %	68 %	83 %
ZIP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	42 %	61 %	42 %	61 %
ZIP2 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	15 %	37 %	15 %	37 %
ZIP3 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	43 %	61 %	45 %	61 %
ZIP4 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	37 %	54 %	37 %	54 %
ZRT1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	21 %	41 %	23 %	42 %
ZRT2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	20 %	37 %	20 %	37 %
ZNT1 (<i>Thlaspi caerulescens</i>)	36 %	53 %	36 %	53 %

3.7 Charakterisierung der cDNA-Klone in Hefe

Die im hochaffinen Fe-Transport defiziente Hefemutante AMY43 (*Afr1::LEU2*, MAS MARQUES 1998) und die in beiden Fe-Transportsystemen defiziente Mutante DEY1453 (*fet3/fet4*, EIDE *et al.* 1996) wurden mit den *LeIRT*-cDNA-Klonen sowie mit dem leeren Vektor pUE1 transformiert. Dabei zeigte sich, daß die mit leerem Vektor transformierten AMY43-Kolonien auf Vollmedium mit 200 µM BPDS nicht mehr wachsen konnten, während die mit den putativen Fe-Transporter-cDNAs *LeIRT1* und *LeIRT2* transformierten Kolonien auf diesen Platten wuchsen (nicht gezeigt). Diese Ergebnisse waren aber nur schlecht reproduzierbar. Deshalb wurde in den folgenden Analysen die *fet3/fet4*-Doppelmutante DEY1453 verwendet.

3.7.1 Wachstum einer *fet3/fet4*-Hefemutante in Abhängigkeit der Tomaten-cDNAs

Das Wachstum der Transformanten wurde auf Vollmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen des Fe²⁺-spezifischen Chelators BPDS untersucht. Bei Konzentrationen unterhalb von 45 µM konnten alle Kolonien, unabhängig vom Plasmid mit dem sie transformiert waren, wachsen. Oberhalb von 60 µM BPDS konnten die DEY1453-Kolonien nicht mehr wachsen. Lediglich ein enger Bereich zwischen 50 und 55 µM ermöglichte das Wachstum der komplementierten im Gegensatz zu den nicht-komplementierten Kolonien (Abb. 16). Die mit leerem Vektor pUE1 transformierten Zellen konnten auf Vollmedium mit 55 µM BPDS nicht wachsen, während die mit den putativen Fe-Transportern *LeIRT1* und *LeIRT2* transformierten Zellen auf diesen Platten zu deutlichen Kolonien heranwuchsen (Abb. 16).

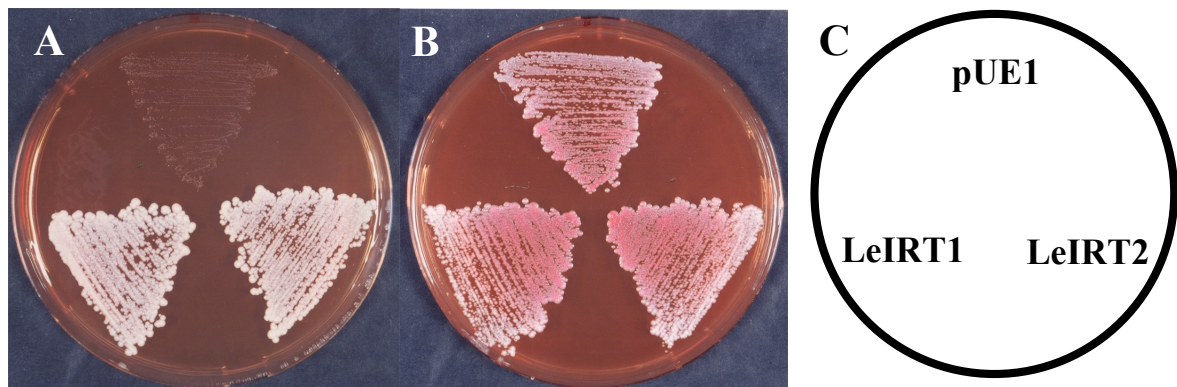


Abb. 16: Wachstum der Transformanten des Hefestammes DEY1453 auf YPD-Medium mit 55 µM BPDS (A) und auf demselben Medium mit 10 µM zusätzlichem Fe-EDTA (B). Die Hefen wurden ausgestrichen wie in (C) beschrieben.

3.7.2 Fe-Aufnahme einer *fet3/fet4*-Hefemutante in Abhängigkeit der Tomaten-cDNAs

Der Transport von Eisen in die transformierten Hefezellen wurde mit Hilfe des Radioisotops ^{59}Fe gemessen. Die DEY1453-Zellen, transformiert mit *LeIRT1* und *LeIRT2*, zeigten deutliche Fe-Aufnahmeraten (5-6 bzw. 4-5 pmol/min 10^6 Zellen), während die mit dem leeren Plasmid transformierten Zellen nur geringe (0,8-1,2 pmol/min 10^6 Zellen) Transportraten aufwiesen (Abb. 17).

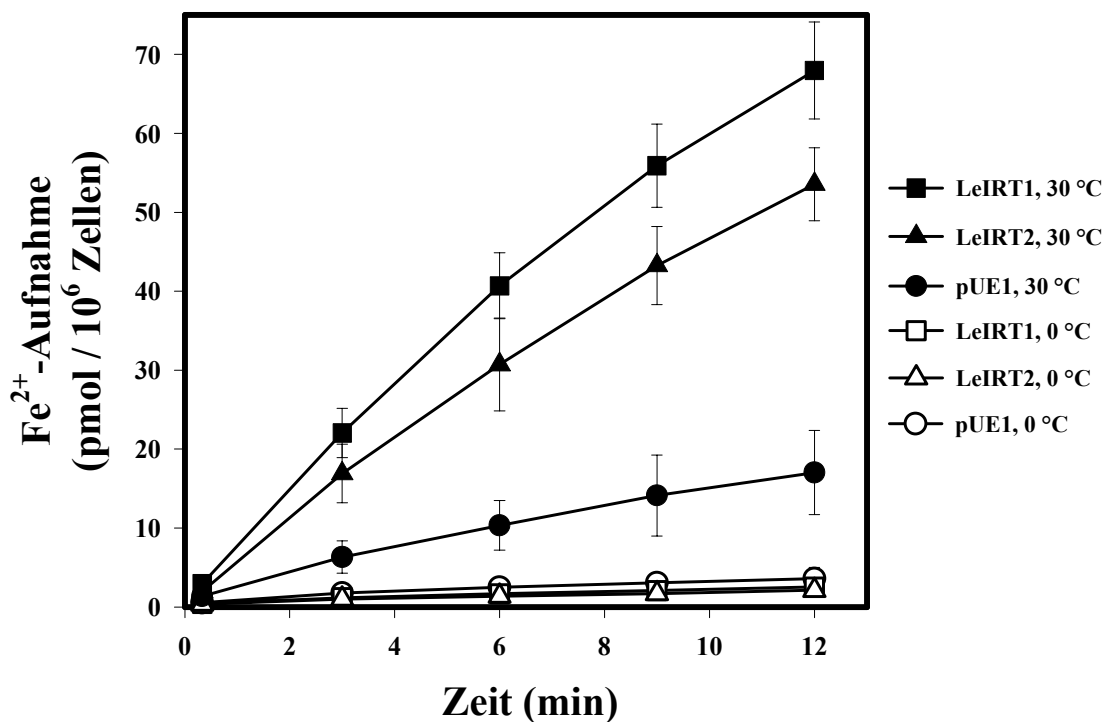


Abb. 17: ^{59}Fe -Transport des Hefestammes DEY1453 transformiert mit dem Expressionsplasmid pUE1 (Kreise) oder den *LeIRT*-cDNAs (Dreiecke und Quadrate) in pUE1. Abgebildet sind die Meßwerte bei 30 °C (gefüllte Symbole) und Kontrollwerte auf Eis (leere Symbole). Die Daten zeigen Mittelwerte aus drei Experimenten mit ihren Standardabweichungen.

3.7.3 Valenz des transportierten Eisens

Für Strategie I-Pflanzen ist die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} Voraussetzung für die Fe-Aufnahme in die Wurzeln (CHANEY *et al.* 1972). Diese Versuche konnten nun auf molekularere Ebene wiederholt und bestätigt werden. Abb. 18 zeigt, daß die LeIRT1-vermittelte Aufnahme von Fe^{2+} gegenüber der von Fe^{3+} erheblich bevorzugt wird und daß die Zugabe des Fe^{2+} -spezifischen Chelators BPDS die Fe-Aufnahme fast vollständig inhibiert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit LeIRT2 erhalten (nicht gezeigt).

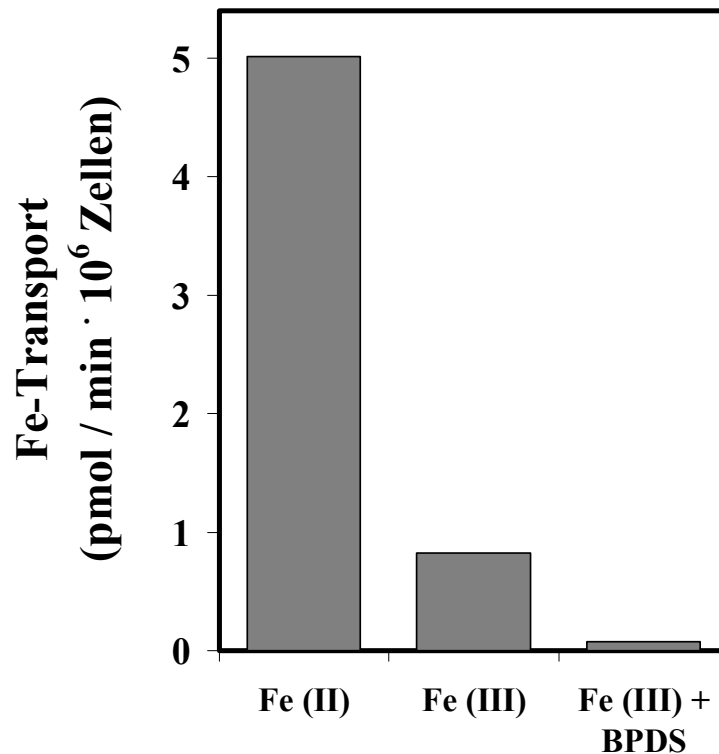


Abb. 18: Einfluß des Fe^{2+} -spezifischen Chelators BPDS auf die LeIRT1-abhängige ^{59}Fe -Aufnahme in Zellen des Hefestammes DEY1453. Zwei μM Fe^{2+} -Ascorbat, Fe^{3+} -HEDTA oder Fe^{3+} -HEDTA und 10 μM BPDS wurden als Substrat angeboten ($n = 2$). Die Aufnahmeraten der mit dem leeren Kontrollplasmid pUE1 transformierten Zellen wurden abgezogen. Sie lagen unter 20 % der abgebildeten Transportraten.

3.7.4 Kinetische Parameter der LeIRT-Proteine

Um Aufschluß über die Transportkinetik zu erlangen, wurden Fe-Transportexperimente mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt. Auch die mit dem leeren Plasmid transformierten Zellen wiesen signifikante Fe-Transportraten auf. Dieser Transport war jedoch selbst bei 200 μM Fe^{2+} nicht gesättigt, weshalb er als unspezifisch betrachtet wurde. Die Kontroll-Transportraten der Hefen mit leerem Plasmid wurden daher von denen der Hefen mit LeIRT1 oder LeIRT2 abgezogen (Abb. 19).

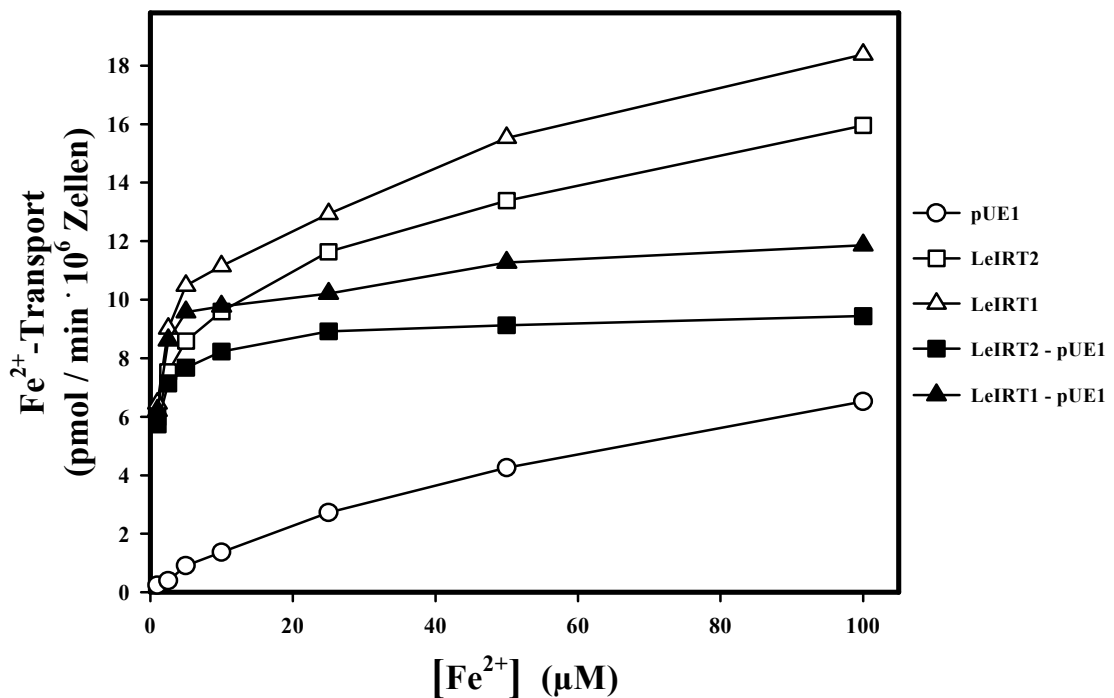


Abb. 19: Substratsättigung des Fe²⁺-Transportes von mit den *LeIRT*-cDNAs (offene Dreiecke und Quadrate) oder dem leeren Expressionsplasmid pUE1 (offene Kreise) transformierten DEY1453-Hefezellen. Die gefüllten Symbole repräsentieren die *LeIRT*-abhängigen Transportraten (Raten der *LeIRT*-transformierten Zellen abzüglich der Kontrollen). Von allen Transportraten wurden die Kontrollraten auf Eis abgezogen. Um das Substrat vollständig zu reduzieren, war in allen Experimenten ein 100-facher Überschuß an Ascorbat vorhanden.

3.7.5 Transportspezifität der *LeIRT*-Proteine

Kompetition des Fe-Transportes

In ersten Kompetitionsstudien wurde den Fe-Aufnahmeversuchen ein 100-facher Überschuß an zweiwertigen Metallionen zugesetzt. Die Metallionen wurden unmittelbar nach der Substratlösung zu den Zellen pipettiert. Dabei konnten Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ und Cd²⁺, aber nicht Ca²⁺, Mg²⁺ und Sr²⁺ den Fe-Transport inhibieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Durch Mg²⁺ wurden die Aufnahmeraten stabilisiert, so daß beschlossen wurde, alle weiteren Aufnahmemessungen in Gegenwart von 0,1 mM MgSO₄ durchzuführen.

Die Kationen, die den Fe-Transport inhibiert hatten, wurden in neue Kompetitionsstudien mit nur einem zehnfachen molaren Überschuß gegenüber Fe²⁺ eingesetzt. Dabei zeigten Ni²⁺, Cd²⁺ und Zn²⁺ die stärksten inhibitorischen Effekte während die Inhibition durch Mn²⁺ weniger deutlich war (Abb. 20). Die Zugabe von Cu²⁺ zum Fe-Aufnahmetest inhibierte die Aufnahme, jedoch

waren die Raten nicht linear, und ein erheblich höherer Hintergrund auf Eis war zu beobachten (nicht gezeigt). Vermutlich vermittelten die Cu-Ionen eine erhebliche, unspezifische Bindung von Fe an die Zelloberfläche der Hefen. Auch unter dem Einfluß von Co^{2+} konnte kein linearer Fe-Transport gemessen werden (nicht gezeigt).

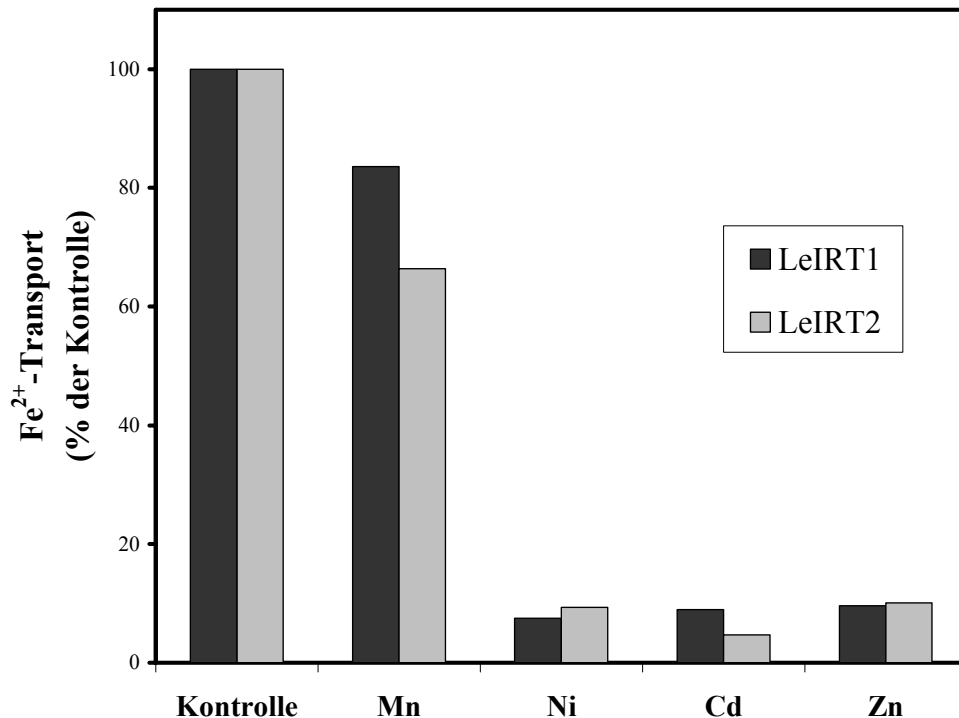


Abb. 20: Einfluß von 20 μM unterschiedlicher Metallionen auf den Fe-Transport transformierter Hefezellen des Stammes DEY1543. Die Substratlösung enthielt 2 μM Fe^{2+} in Gegenwart von Ascorbat. Die Metallionen wurden unmittelbar nach der Substratzugabe zu den Hefezellen pipettiert. Gezeigt sind die Transportraten gemessen bei 30°C abzüglich der Kontrollwerte auf Eis.

Wachstum von Mn-, Zn-, und Cu-Aufnahmemutanten in Abhängigkeit der Tomaten-cDNAs

Das IRT1-Protein aus *Arabidopsis thaliana* ist in der Lage, die Mn-aufnahmedefiziente Hefemutante SLY8 (*smf1*) und die Zn-aufnahmedefiziente Mutante ZHY3 (*zrt1*, *zrt2*; ZHAO UND EIDE 1996B) sowohl in Bezug auf das Wachstum auf metall-limitierendem Medium als auch auf die Metalltransport-Aktivität zu komplementieren (KORSHUNOVA *et al.* 1999).

Um die Spezifität des Kationentransportes der beiden LeIRT-Proteine zu analysieren, wurden dieselben Stämme sowie die Kupfer-Transportmutante 64p ($\Delta\text{ctr1}::\text{HIS3}$, DANCIS *et al.* 1994A) mit dem leeren Vektor pUE1 oder mit den *LeIRT*-cDNAs in pUE1 transformiert. In je drei uracilprototrophen Kolonien wurde zunächst die Anwesenheit des Plasmides überprüft und das Wachstum auf Chelator-gepuffertem Vollmedium (YPD) analysiert. Das Wachstum aller drei metallaufnahme-defizienten Mutanten auf metall-limitierenden Medien wurde durch die *LeIRT*-

cDNAs, aber nicht durch den leeren Vektor komplementiert (Abb. 21).

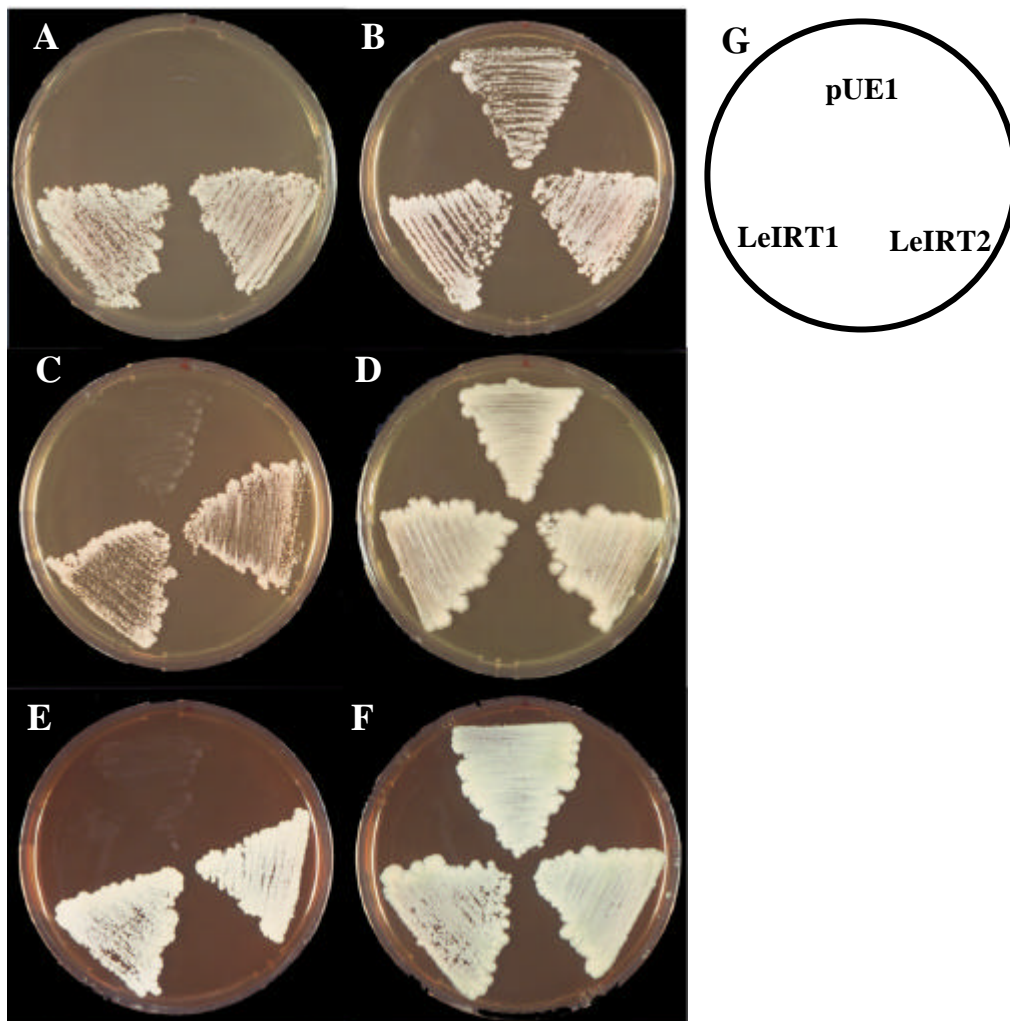


Abb. 21: Wachstum von drei metallaufnahme-defizienten Hefemutanten in Abhängigkeit der LeIRT-cDNAs:

Die Transformanten wurden ausplattiert wie in G gezeigt. Die Mn-Aufnahmemutante SLY8 (A) auf YPD mit 50 mM MES (pH 6,2) und 18 mM EGTA und (B) auf gleichem Medium mit 2 mM zusätzlichem MnSO₄. Die Cu-Aufnahmemutante 64p (C) auf YPD mit 50 mM MES (pH 6,2) und 0,6 mM EDTA und (D) auf gleichem Medium mit 100 μM zusätzlichem CuSO₄. Die Zn-Aufnahmemutante ZHY3 auf (E) YPD mit 50 mM MES (pH 6,2) und 0,7 mM EDTA und (F) auf gleichem Medium mit 150 μM zusätzlichem ZnSO₄.

3.8 Expression der *LeIRT*-Gene auf RNA-Ebene

Die Expression der *LeIRT*-Gene auf RNA-Ebene wurde durch Northern-Blot-Analysen untersucht. Dabei erwies es sich als schwierig, zwischen den beiden Transkripten zu unterscheiden, weil die Nukleotidsequenzen so ähnlich sind, daß Kreuzhybridisierungen nicht zu vermeiden waren (Daten nicht gezeigt).

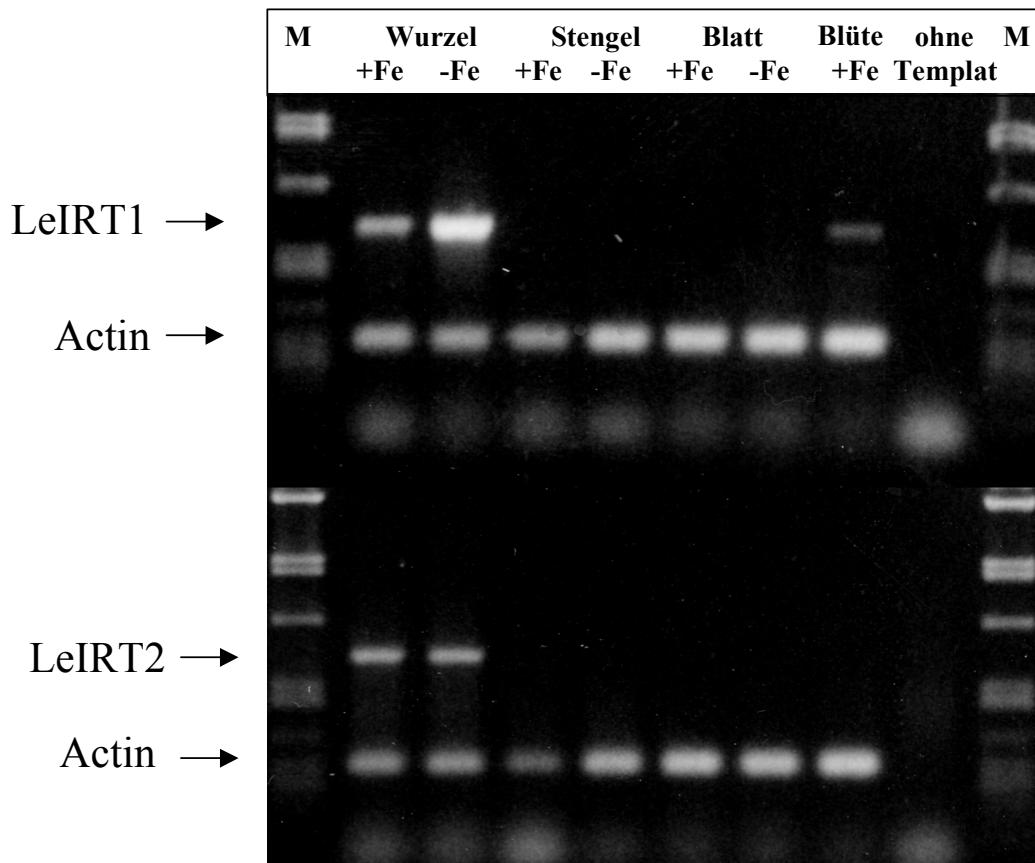


Abb. 22: Transkriptanalyse der *LeIRT*-Gene in Tomaten durch semiquantitative RT-PCR. Zwei Wochen alte Tomatenkeimlinge wurden sechs Tage lang in Hydrokultur mit und ohne Fe herangezogen und die RNA aus Wurzeln, Stengeln und Blättern wurde isoliert. Eine Pflanze wurde auf Fe-haltiger Nährlösung bis zur Blüte kultiviert bevor ihre Blüten-RNA isoliert wurde. 2 µg DNA-freie RNA aus den angegebenen Geweben wurden mit einem oligo(dT)-Primer revers transkribiert und anschließend wurden PCR-Reaktionen mit *LeIRT1*- oder *LeIRT2*-spezifischen sowie Actin-spezifischen Primern durchgeführt. Ein typisches Gel ist gezeigt (n=4).

Die Unterscheidung zwischen den beiden *LeIRT*-Sequenzen war nur durch „Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion“ (RT-PCR)-Versuche möglich. Hierzu wurden genspezifische Primer verwendet, die kurze, nicht-konservierte Bereiche der beiden *LeIRT*-Sequenzen erkannten (s. Tabelle 4). Als Ladekontrolle wurden PCR-Reaktionen in Gegenwart der Primer To-ACT1 und To-ACT2 durchgeführt. Diese Primer sind so gewählt, daß sie ein 270 bp großes Fragment simultan aus sechs Actin-Genen amplifizieren. Actin-Gene unterliegen kaum

transkriptioneller Kontrolle, so daß von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden kann (Richard Meagher, Athens GA, pers. Mitt.).

In diesen Analysen konnten signifikante Unterschiede in der Expression der beiden *LeIRT*-Gene gefunden werden: Zum einen fanden sich auch in Fe-suffizienten Wurzeln geringe Transkriptmengen, zum anderen zeigte sich, daß *LeIRT1* stark durch Fe-Mangel induziert war, während die Expression von *LeIRT2* unverändert blieb. In den Blüten acht Wochen alter Pflanzen konnten geringe Transkriptmengen von *LeIRT1* nachgewiesen werden (Abb. 22). Kontrollen zeigten, daß die Produktmenge unter den angegebenen Bedingungen im linearen Amplifikationsbereich, also proportional zur Menge an mRNA war. In PCR-Versuchen ohne die reverse Transkriptionsreaktion wurde kein Produkt erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.9 Analyse der *LeIRT*-Gene

3.9.1 Southern Blot-Analysen

Um die Organisation der *LeIRT*-Gene im Genom zu charakterisieren, wurde Tomaten-DNA isoliert und mit Enzymen gespalten, die selbst nicht innerhalb der cDNA-Sequenzen schneiden. Diese gespaltenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und nach „Southern“-Transfer auf Nylonmembran mit *LeIRT1*- oder *LeIRT2*-Sonden hybridisiert. Die deutlichsten Hybridisierungssignale wurden nach Spaltung mit den Enzymen *Bgl*II, *Eco*RI, *Kpn*I und *Hind*III erhalten (Abb. 23A). Durch die hohe Sequenzähnlichkeit konnte in diesen Analysen nicht zwischen *LeIRT1* und *LeIRT2* unterschieden werden (Daten nicht gezeigt).

Insbesondere die etwa 9 kb große Bande, die nach der Spaltung mit *Bgl*II hybridisiert hatte, wurde weiter untersucht. Doppelverdaus mit *Bgl*II und je einem anderen Enzym wurden durchgeführt, um kleinere Fragmente zu identifizieren (Abb. 23B). Dabei erwies sich die 9 kb-große Bande als Doppelbande, deren mit *LeIRT2* hybridisierender Anteil durch Spaltung mit *Apa*I, *Sal*I und *Xba*I zu Fragmenten der Größe 1,0 kb; 2,4 kb und 3 kb verkleinert wurde. Die diffusen Banden und der hohe Hintergrund weisen auf weitere kreuzhybridisierende Sequenzen im Tomatengenom hin.

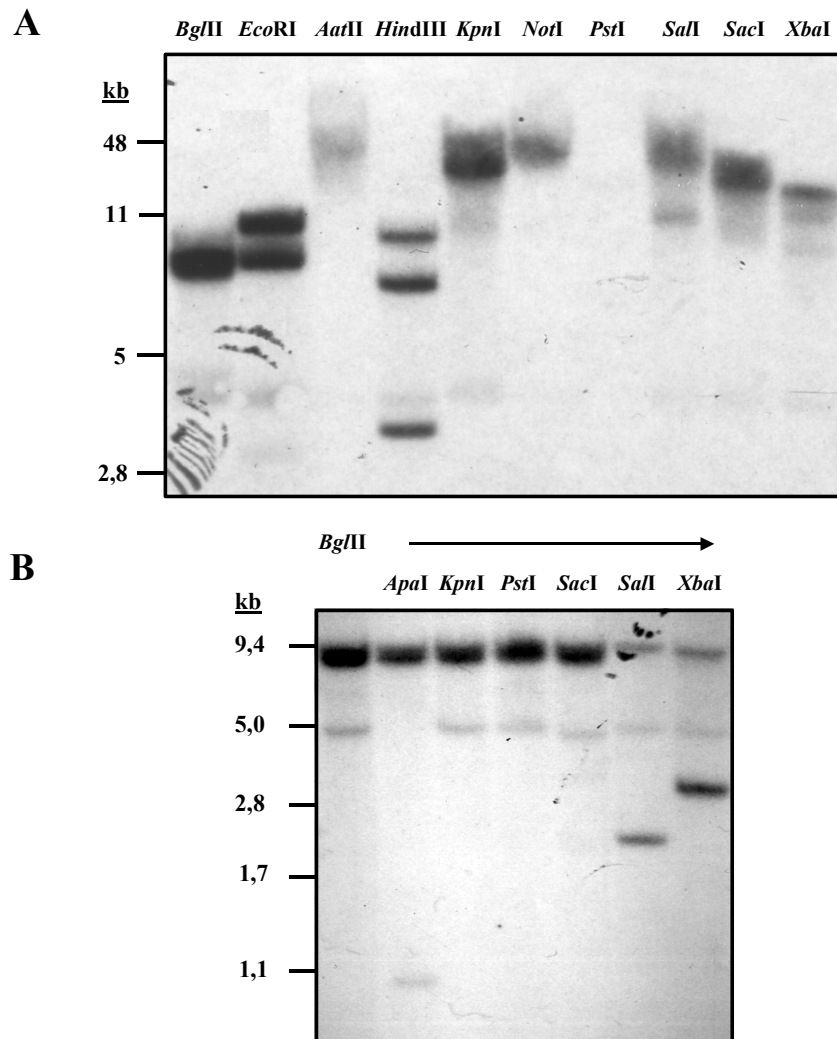


Abb. 23: Southern-Blot-Analyse der *LeIRT*-Gene im Tomaten-Genom. (A) 30 µg genomische Tomaten-DNA wurden mit den genannten Enzymen gespalten, elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nylonmembran überführt. Die Filter wurden mit der 5'-Sequenz (*SalI*-*NcoI*-Fragment) der *LeIRT2*-cDNA hybridisiert. (B): Analyse der 9 kb-Bande des *BglII*-Verdaus: 30 µg genomische DNA wurden mit *BglII* und den angegebenen Enzymen gespalten und wie in (A) hybridisiert.

3.9.2 Intron/Exon-Struktur der *LeIRT*-Gene

Eine Tomatengenbank stand mir nicht zur Verfügung. Versuche zur Isolierung der *LeIRT*-Gene durch Konstruktion einer Mini-Genbank in einem Plasmidvektor und anschließender Identifizierung der Gene durch Koloniehybridisierung führten nicht zum Erfolg. Daher wurde beschlossen, die genomischen Sequenzen durch PCR-Experimente zu amplifizieren.

Die Exon-Intron-Struktur der *LeIRT*-Gene wurde durch PCR-Analysen aufgeklärt: die Primer IRT1-m und Tir-EM amplifizierten in der *LeIRT1*-cDNA ein 342 bp großes Fragment, während in genomischer Tomaten-DNA ein 540 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Dieses Fragment

wurde kloniert und sequenziert. Es enthielt neben der bekannten cDNA-Sequenz zwei Introns von 116 und 82 bp (Abb. 24, Abb. 26).

Die Primer IRT2-m und Tir-EM amplifizierten in der *LeIRT2*-cDNA ein 370 bp großes Fragment, während in genomischer Tomaten-DNA ein 1443 bp großes Fragment amplifiziert wurde. Dieses Fragment enthielt neben der bekannten cDNA-Sequenz zwei Introns von 984 und 89 bp (Abb. 24, Abb. 26). PCR- und Restriktionsanalysen zeigten, daß außer den genannten keine weiteren Introns in den *LeIRT*-Genen vorhanden sind.

<i>LeIRT1</i> : (5' > 3')	
1118 AATTGCCATG	...GTGGTTGCAGGTGTTAGAGC ₁₂₅₃
1384 CATCCTACAG	...TCTAATACAGGCGGAGTATA ₁₄₈₅
<i>LeIRT2</i> : (3' > 5')	
849 CATCGCTATG	...GTTTTTGCAGGTGTTAGAGC ₁₈₅₂
1983 CATTCTCCAG	...TTTCATGCAGGCTGAGTACA ₂₀₉₁

Abb. 24: Intron/Exon-Grenzen der *LeIRT*-Gene. Die blau-gedruckten Sequenzen gehören zu Introns.

3.9.3 Inverse PCR-Versuche

Teile der 5'-untranskribierten Bereiche der *LeIRT*-Gene wurden durch inverse PCRs amplifiziert. Dazu wurde genomische Tomaten-DNA mit verschiedenen Enzymen gespalten. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Behandlung mit T4-Ligase zirkularisiert und die unbekannten Sequenzen durch PCR mit auswärts gerichteten Primern amplifiziert. Dazu wurden zunächst Primer verwendet, die beide *LeIRT*-Gene erkennen und in einer anschließenden *nested* PCR solche Primer, die für *LeIRT1* oder für *LeIRT2* spezifisch sind (Tabelle 4).

Tabelle 4: Übersicht über die zur Isolation der genomischen DNA-Fragmente verwendeten Primer

<u>Primer</u>	<u>Richtung bzgl. der cDNA</u>	<u>Spezifität</u>
TIR-ME	5' → 3'	erkennt beide <i>LeIRT</i> -Gene
TIR-EM	3' → 5'	erkennt beide <i>LeIRT</i> -Gene
IRT1-m	5' → 3'	spezifisch für <i>LeIRT1</i>
IRT2-m	5' → 3'	spezifisch für <i>LeIRT2</i>
IRT-5'	3' → 5'	erkennt beide <i>LeIRT</i> -Gene
IRT-3'	5' → 3'	erkennt beide <i>LeIRT</i> -Gene
IRT15r	3' → 5'	spezifisch für <i>LeIRT1</i>
IRT13r	5' → 3'	spezifisch für <i>LeIRT1</i>
IRT25r	3' → 5'	spezifisch für <i>LeIRT2</i>
IRT23r	5' → 3'	spezifisch für <i>LeIRT2</i>

Für *LeIRT1* konnte ein 470 bp großes 5'-Fragment isoliert werden, das durch Spaltung mit *Bgl*II und *Bcl*II, Zirkularisierung und anschließender PCR mit den Primern IRT-5' und TIR-ME sowie *nested* PCR mit IRT-15r und IRT1-m amplifiziert wurde.

Für *LeIRT2* wurde ein 207 bp großes 5'-Fragment isoliert, das durch Spaltung mit *Mfe*I und *Eco*RI, Zirkularisierung und anschließender PCR mit den Primern IRT-5' und TIR-ME sowie *nested* PCR mit IRT-25r und IRT2-m amplifiziert wurde.

3.9.4 Direkte PCR-Versuche

In *Arabidopsis* liegt das *IRT1*-Gen in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem homologen Gen, welches als *IRT2* bezeichnet wurde. Diese Kenntnis, sowie ein ca. 2,8 kb großes PCR-Fragment, das in Kontrollversuchen der inversen PCRs immer wieder auftauchte, ließen vermuten, daß auch in Tomaten die beiden *LeIRT*-Gene direkt benachbart sein könnten. Diese Frage wurde durch PCR-Versuche mit auswärts gerichteten Primern untersucht. Durch den einzelnen Primer IRT-3', der beide *LeIRT*-Gene erkennt, wurde ein etwa 2 kb großes Fragment amplifiziert. Zudem konnte mit den Primern IRT13r und IRT23r, die spezifisch für *LeIRT1* oder *LeIRT2* sind, ein 1,8 kb großes Fragment amplifiziert werden. Daraus wurde geschlossen, daß die beiden *LeIRT*-Gene tatsächlich direkt benachbart sind, und zwar in einer Ende-an-Ende-Orientierung (Abb. 26). Diese Vorstellung wurde in Kontrollreaktionen mit Primern, die aufgrund der neuen Sequenzinformation generiert wurden, bestätigt.

3.9.5 Transkriptionsstart der *LeIRT*-Gene

Die Kenntnis der genomischen 5'-untranslatierten Sequenzen machte es möglich, durch *primer extension*-Analysen die Transkriptions-Startpunkte der *LeIRT*-Gene zu finden. Dazu wurden die Primer IRT15r und IRT25r radioaktiv markiert. RNA aus Fe-defizienten Tomatenwurzeln wurde mit ihnen revers transkribiert. Mit denselben Primern wurden Sequenzreaktionen der genomischen Klone durchgeführt (Abb. 25).

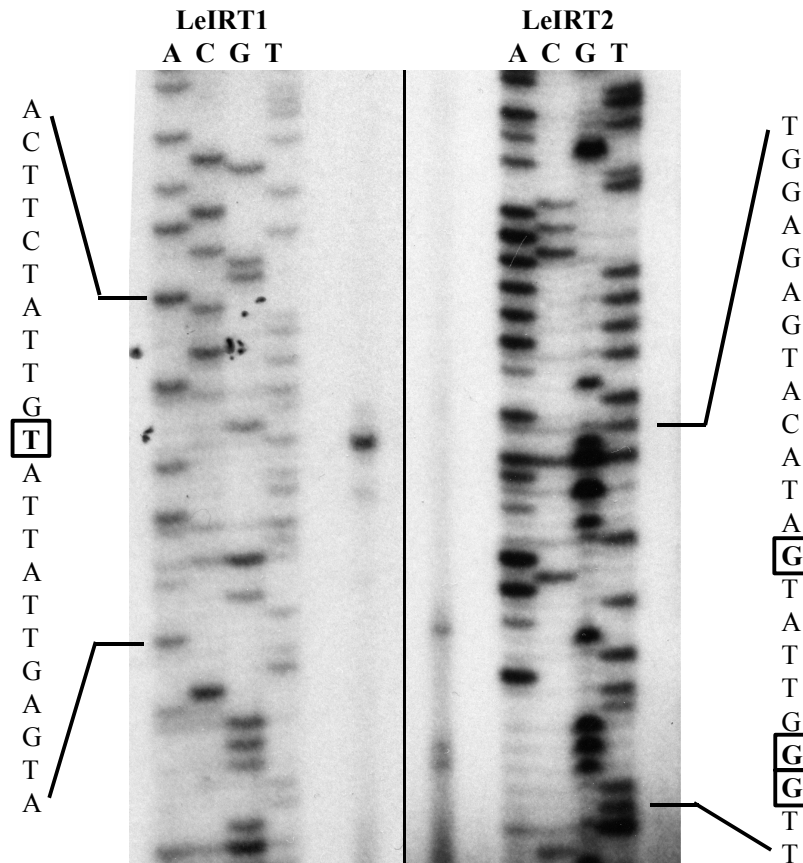


Abb. 25: *Primer extension*-Reaktionen zur Ermittlung des Transkriptionsstarts der *LeIRT*-Gene: Die Oligonucleotide IRT15r und IRT25r wurden mit ^{32}P endmarkiert und in reverse Transkriptionsreaktionen mit Wurzel-RNA Fe-defizienter Tomaten eingesetzt (mittlere Spuren). Die gleichen Primer wurden für Sequenzreaktionen genomischer Klone von *LeIRT1* (links) und *LeIRT2* (rechts), verwendet. Putative Transkriptionsstartpunkte sind durch Kästen markiert.

Der Transkriptionsstart des *LeIRT1*-Gens (A_{452}) liegt 78 bp stromaufwärts zum Translationsstartcodon bzw. 18 bp vor dem 5'-Ende des cDNA-Klones (Abb. 25, Abb. 26). Eine putative TATA-Sequenz ($_{419}\text{GTATATATAAATAG}_{432}$) konnte etwa 25 bp *upstream* des Transkriptionsstarts identifiziert werden. Eine putative CAAT-Box ($_{326}\text{CACCAATTAT}_{335}$) findet sich etwa 120 bp *upstream* des Transkriptionsstarts.

Der Transkriptionsstart des *LeIRT2*-Gens war weniger klar zu identifizieren. Als wahrscheinlichster Kandidat kommt G_{5821} , 64 bp stromaufwärts zum Translationsstart in Frage, doch

auch für G₅₈₁₅ und für G₅₈₁₄ wurden signifikante reverse-Transkription-generierte Banden gefunden. Im 5'-Bereich des *LeIRT2*-Gens, 18 - 25 bp *upstream* des putativen Transkriptionsstarts findet sich zwar eine AT-reiche Regionen, doch wurde die Konsensus-Sequenz für eukaryotische TATA-Boxen nur schwach erfüllt.

3.9.6 Übersicht über die *LeIRT*-Gene

Die Sequenz der *LeIRT*-Gene ist unter der Accession-Nummer AF246266 in der GenBank™ veröffentlicht. Aus den genomischen Sequenzen und den cDNA-Sequenzen konnte eine funktionelle Genkarte erstellt werden (Abb. 26):

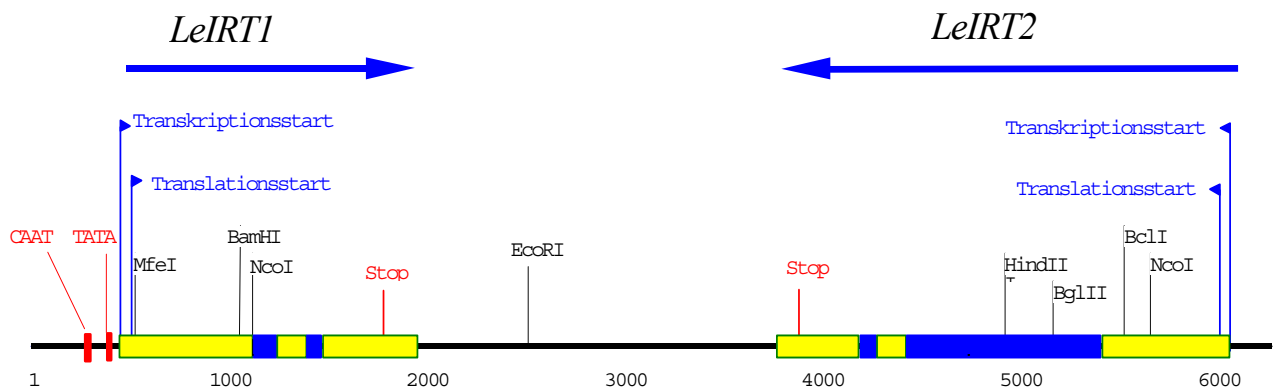


Abb. 26: Karte der *LeIRT*-Gene: Exonsequenzen sind gelb, Introns blau dargestellt. Die Transkriptions(TK)-Startpunkte wurden durch *Primer Extension* gefunden, die Translations(TL)-Startpunkte sind die Startcodons der langen offenen Leserahmen. Einige Restriktionsschnittstellen sind aufgeführt. Die Pfeile geben die Leserichtung an.

3.10 Fe-Reduktaseaktivität der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*

Die eingangs beschriebenen Schwierigkeiten der molekularen Charakterisierung der Fe-Assimilation höherer Pflanzen, insbesondere die wenig erfolgreichen differentiellen *Screening*-Versuche auf RNA- und Proteinebene (GIRITCH *et al.* 1997, HERBIK *et al.* 1996, SCHMIDT UND BUCKHOUT 1997) sowie das Scheitern der Komplementation von *fre*-Hefemutanten, machten es sinnvoll, einen neuen Modellorganismus zu suchen. Dieser sollte mikrobiologisch und genetisch handhabbar, leicht zu kultivieren und den höheren Pflanzen phylogenetisch näher verwandt sein als die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Hierfür erschien die einzellige, eukaryotische Alge *Chlamydomonas reinhardtii* als geeignet (ROCHAIX 1995).

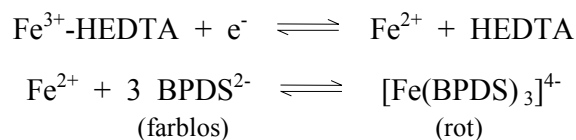
Die Eisenassimilationsreaktionen der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht. Es wurde zunächst gemessen, ob und mit welcher Kinetik diese Alge Eisenchelate reduzieren kann, ob die Eisenchelatreduktase unter Eisenmangel induziert wird (eine typische „Strategie I“-Reaktion), und ob diese Induktion mit der Eisenaufnahme korreliert ist (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998).

3.10.1 Pflanzenphysiologische Beobachtungen

Algen, die länger als eine Woche unter Eisenmangel heranwuchsen, zeigten eine deutlich bleichere Farbe gegenüber solchen, denen ausreichend Fe zur Verfügung stand. Diese Chlorosen sind vermutlich auf die eisenabhängige Chlorophyllbiosynthese zurückzuführen. Mikroskopisch erschienen eisengehungerte Algen wesentlich „klebriger“ als eisensuffiziente. Sie hatten gegenüber den Kontrollen eine deutlich höhere Tendenz, sich in Zweier- bis Vierergruppen aneinanderzulagern (nicht gezeigt).

3.10.2 Etablierung eines Eisenchelat-Reduktasetests an Algen

Um die extrazelluläre Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten zu messen (2.2.3) mußte zunächst ein Testsystem erarbeitet werden. Dieser Test ist an die Methode von DANCIS *et al.* 1990 angelehnt und beruht auf der Bindung von BPDS an Fe^{2+} mit gleichzeitiger Farbänderung. Er ist bei ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998 ausführlich beschrieben.



In einem ähnlichen System wurde die Reduktion von Hexacyanoferrat(III) durch Abnahme der Absorption bei 420 nm gemessen. Diese Tests unterschieden sich wenig von denen mit Fe^{3+} -HEDTA als Substrat.

3.10.3 Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität durch Eisenmangel

In den ersten Voruntersuchungen wies die einzellige Alge *Chlamydomonas reinhardtii* nach vier Tagen Eisenmangel stark erhöhte Reduktionsaktivität gegenüber Fe^{3+} -HEDTA auf (Abb. 27). Die Chloroplasten-ATPase-defiziente Mutante CC-980 zeigte unter den gleichen Bedingungen kaum Fe^{3+} -Reduktionsaktivität, unabhängig von der Fe-Ernährung (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998). Ähnliche Ergebnisse wurden unter Verwendung von Hexacyanoferrat(III) gemessen (Daten nicht gezeigt).

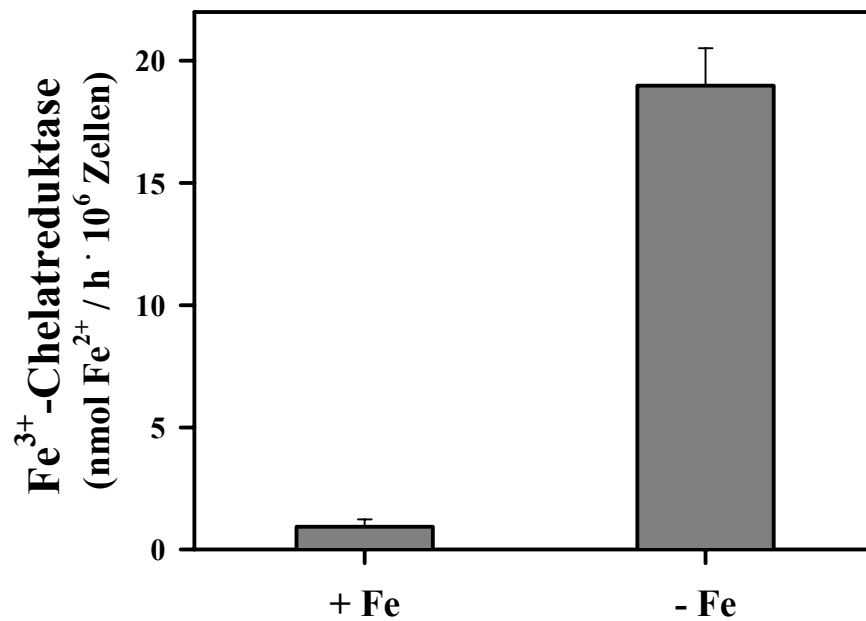


Abb. 27: Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii* unter Eisenmangel. Die Zellen wurden auf TAP-Medium mit oder ohne Fe herangezogen. Nach vier Tagen wurde die Fe^{3+} -Reduktaseaktivität gemessen.

3.10.4 Abhängigkeit der Induktion von der Eisenkonzentration im Anzuchtmedium

Die Eisenchelate-Reduktase-Aktivität in *Chlamydomonas reinhardtii* wurde in Abhängigkeit der Eisenkonzentration im Anzuchtmedium untersucht. Dazu wurden die Algen in TAP-Medium mit definierten Eisenkonzentrationen von null bis 15 μM herangezogen. Nach 46 und nach 48 Stunden wurde die Eisenchelate-Reduktion gemessen (Abb. 28). Es zeigte sich ein starker Anstieg der Reduktaseaktivität bei Mediumkonzentrationen unterhalb von 4 μM Fe-EDTA.

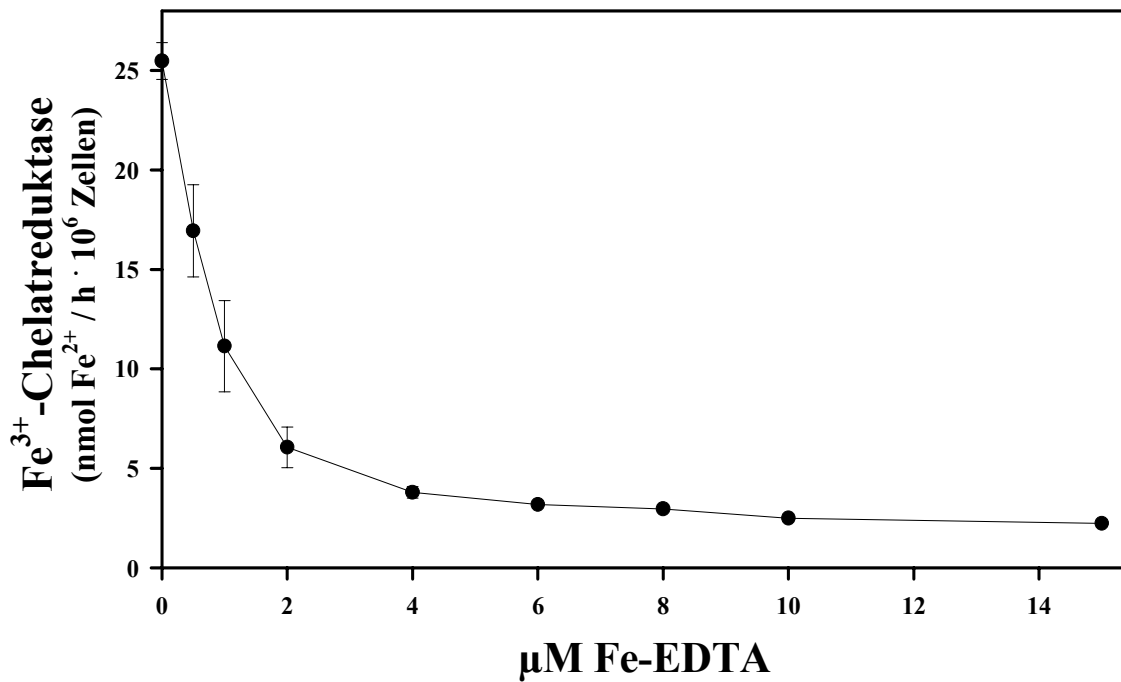


Abb. 28: Abhängigkeit der Eisenchelate-Reduktaseaktivität von der Eisenkonzentration im Anzuchtmedium: Algen wurden zwei Tage lang mit den angegebenen Eisenkonzentrationen kultiviert. Die Reduktaseaktivität wurde nach 46 und 48 h gemessen ($n = 2$).

3.10.5 Kinetik der Induktion der Fe^{3+} -Chelat-Reduktaseaktivität

Die Kinetik der Induktion wurde untersucht, indem die Algen von eisenreichem auf eisenfreies TAP-Medium überimpft wurden und die Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität alle zwei Stunden oder öfter gemessen wurde. Die Fe-Ernährung hatte in diesem Zeitraum keinen Einfluß auf das Wachstum der Algen (Abb. 29A). Die Reduktionsaktivität stieg nach etwa vier Stunden eisendefizientem Wachstum deutlich an, war nach 20-24 Stunden voll induziert und nahm anschließend wieder ab (Abb. 29B). Durch Zufüttern von $10 \mu\text{M FeCl}_3$ ging die Fe^{3+} -Chelatreduktase-Aktivität der Fe-gehungerten Zellen innerhalb weniger Stunden auf nahezu Kontrollniveau zurück.

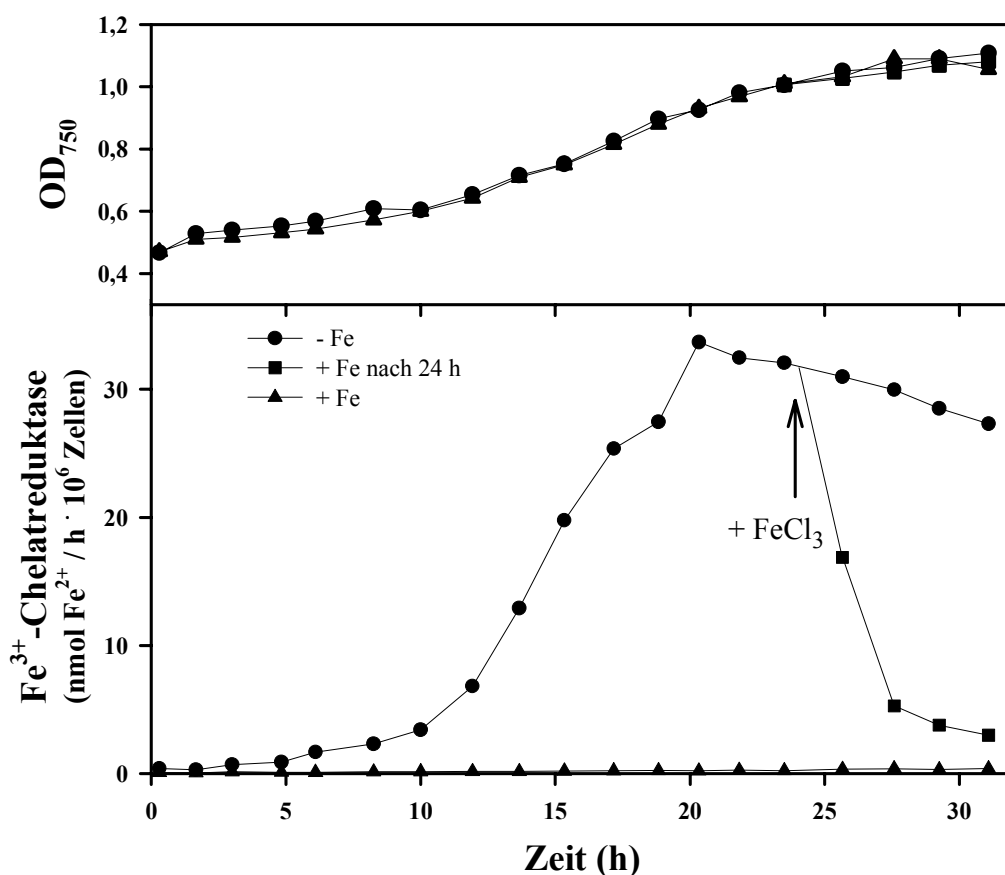


Abb. 29: Kinetik der Induktion der Eisenchelatreduktase unter Eisenmangel in *Chlamydomonas reinhardtii*: Die Algen wurden in TAP-Medium herangezogen, geerntet und in TAP-Medium mit und ohne Fe überführt. Die Reduktaseaktivität wurde alle 1,5 - 2 Stunden gemessen. Nach 24 Stunden wurde die eisengehungerte Kultur geteilt und eine Hälfte mit $10 \mu\text{M FeCl}_3$ rückgefüttert. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes (von drei) sind angegeben.

3.10.6 Substratsättigung der Fe^{3+} -Chelat-Reduktaseaktivität

Die Reduktaseaktivität Fe-gehungelter *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen gegenüber Eisenchelaten war sättigbar. Sie wurde konzentrationsabhängig gemessen und ein apparenter K_m -Wert für Fe-HEDTA konnte bestimmt werden. Er lag bei $31,5 (\pm 2,3) \mu\text{M}$ (Abb. 30). Bei Fe-suffizient herangezogenen Zellen waren die Aktivitäten gering. Die gemessenen Kurven waren komplex und konnten nicht in eine Michaelis-Menten-Kinetik eingepaßt werden. Trotz einer geringen Krümmung bei niedrigen Substratkonzentrationen stellte sich selbst bei $300 \mu\text{M}$ Fe-HEDTA noch keine Sättigung ein (Abb. 30).

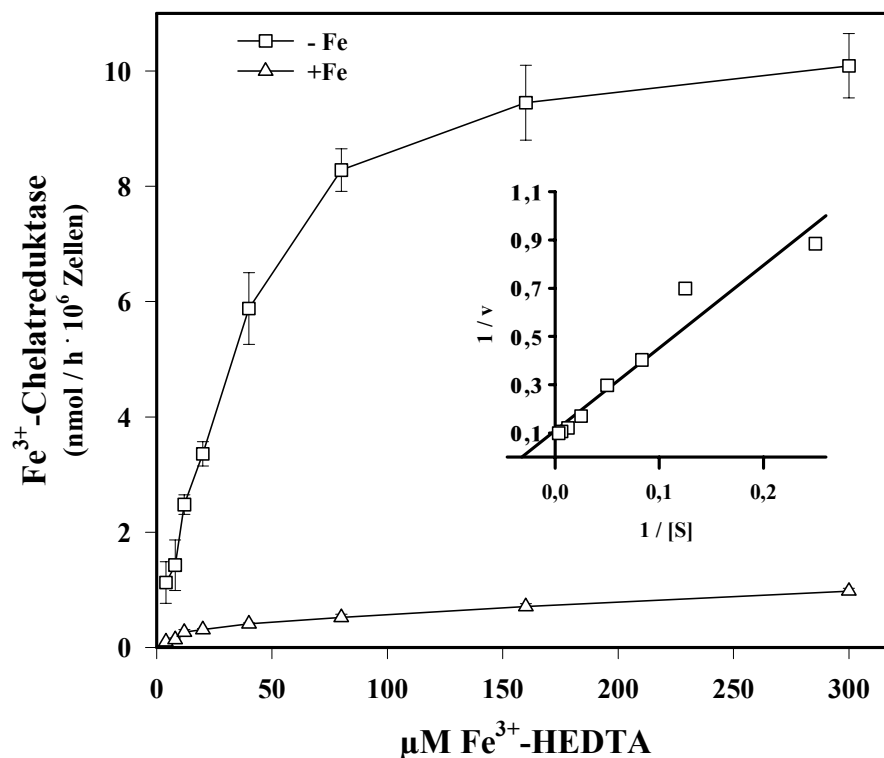


Abb. 30: Die Fe^{3+} -Chelat-Reduktaseaktivität von eisengehungerten und eisensuffizient gewachsenen *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen wurde bei Substratkonzentrationen von 4 bis $300 \mu\text{M}$ Fe-HEDTA gemessen. Mittelwerte von vier unabhängigen Messungen sind dargestellt. Die eingefügte Abbildung zeigt die doppelt-reziproke (Lineweaver-Burk)-Darstellung der Experimente mit den Fe-gehungerten Zellen. Der daraus ermittelte apparente K_m -Wert beträgt $31,5 (\pm 2,3) \mu\text{M}$ FeHEDTA.

3.10.7 pH-Optimum der Fe^{3+} -Chelat-Reduktase

Die Fe^{3+} -Chelatreduktase wurde bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Dabei zeigte sich ein breites Optimum im neutralen Bereich (Abb. 31).

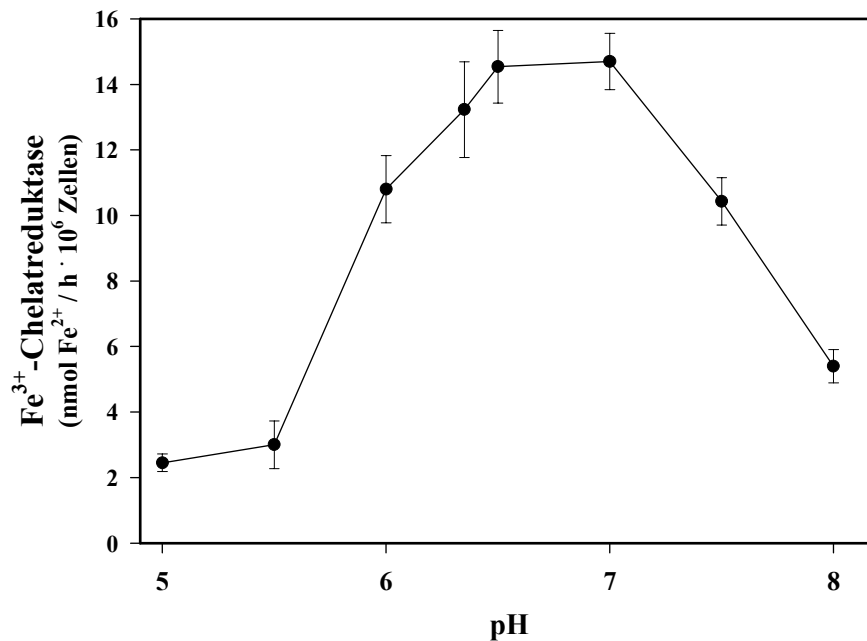


Abb. 31: Einfluß des pH-Wertes auf die Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Zellen wurden einen Tag lang ohne Fe herangezogen, bevor ihre Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität gemessen wurde ($n = 2$). Die Testpuffer enthielten 10 mM MES (pH 5 und 5,5), 10 mM HEPES (pH 6 und 6,35) oder 10 mM Tris (pH 6,5 - 8).

3.10.8 Einfluß von Inhibitoren auf die Fe^{3+} -Chelatreduktase

Erste Hinweise auf die Physiologie der Eisenassimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* wurden durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren in Fe^{3+} -Chelatreduktasetests erlangt. Dafür wurden Ionophoren (Gramicidin, Valinomycin), Entkoppler des Membranpotentials (FCCP, 2,4-Dinitrophenol), das sulfhydryl-reaktive Reagenz PCMBS, Inhibitoren der Photosynthese (DCMU) und der Respiration (KCN), außerdem Diphenyliodoniumchlorid (DPI) und ein komplexes Platinsalz (K_2PtCl_4) fünf Minuten vor der Messung eingesetzt. In den meisten untersuchten Pflanzen konnte die Fe^{3+} -Chelatreduktase durch SH-spezifische Reagenzien inhibiert werden (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). DPI ist ein bekannter Inhibitor der phagozytären NADPH-Oxidase und K_2PtCl_4 hatte die Fe^{3+} -Reduktaseaktivität des *FRE1*-Genproduktes in Hefe inhibiert (HASSETT UND KOSMAN 1995).

Obwohl Gramicidin keinen Einfluß auf die Fe^{3+} -Chelatreduktase hatte, war die Inhibition durch

FCCP deutlich. Auch Valinomycin war bereits in geringer Konzentration (4 μM) in der Lage, die Fe^{3+} -Chelatreduktase deutlich zu inhibieren. Der Entkoppler 2,4-DNP konnte die Fe^{3+} -Chelatreduktase nur gering inhibieren. Dieser Einfluß ist jedoch wahrscheinlich zu gering eingeschätzt, da 2,4-DNP bei pH 7 eine deutliche Eigenabsorption bei 535 nm hat. Diese Daten legen eine Beteiligung des Membranpotentials an der extrazellulären Fe^{3+} -Reduktion nahe. Dabei ist nicht auszuschließen, daß durch FCCP auch die energieliefernden mitochondrialen Membranen entkoppelt wurden.

Die Beteiligung von Sulfhydryl-Gruppen an der Fe^{3+} -Reduktion kann aufgrund der Inhibitionsversuche mit PCMBS mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die Blockierung der Zellatmung durch KCN und der photosynthetischen Lichtreaktion durch DCMU führten nur zu geringer Inhibition der Fe^{3+} -Chelatreduktase. Demgegenüber hatte Tetrachloroplatinat einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Fe^{3+} -Reduktion. Der Effekt von Diphenyliodonium (DPI) war nur gering, vermutlich aufgrund der geringen Mobilität dieses Ions. Die Ergebnisse der Inhibitionsversuche sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Inhibitoren der Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Die Zellen wurden fünf Minuten lang mit den angegebenen Reagenzien behandelt, bevor ihre Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität gemessen wurde. 100 % Aktivität entsprechen $18,4 \pm 2,7 \text{ nmol Fe}^{2+} (\text{h} \cdot 10^6 \text{ Zellen})^{-1}$.

Inhibitor	Konzentration (mM)	Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität (% der Kontrolle)
FCCP	0,1	18,6
FCCP	0,02	25,1
Gramicidin	0,1	100,3
2,4-DNP	0,1	83,8
PCMBS	0,1	100,6
KCN	1,0	82,4
DCMU	0,1	86,1
K_2PtCl_4	0,1	61,6
DPI	0,1	90,3
Valinomycin	0,004	60,4

3.10.9 Rolle der Eisenchelat-Reduktase bei der Eisenaufnahme

Um die Frage zu klären, ob die Eisenchelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii* zur Eisenassimilation beiträgt, wurden Voruntersuchungen durchgeführt. Wenn die Reduktion von Fe^{3+} -Chelaten zur Eisenassimilation notwendig ist, so sollte die Anwesenheit von BPDS das intermediär gebildete Fe^{2+} abfangen und dessen Aufnahme verhindern. Die Algen würden dann Eisenmangelsymptome wie Wachstumsretardierung und gesteigerte Fe^{3+} -Reduktaseaktivität zeigen (CHANEY *et al.* 1972).

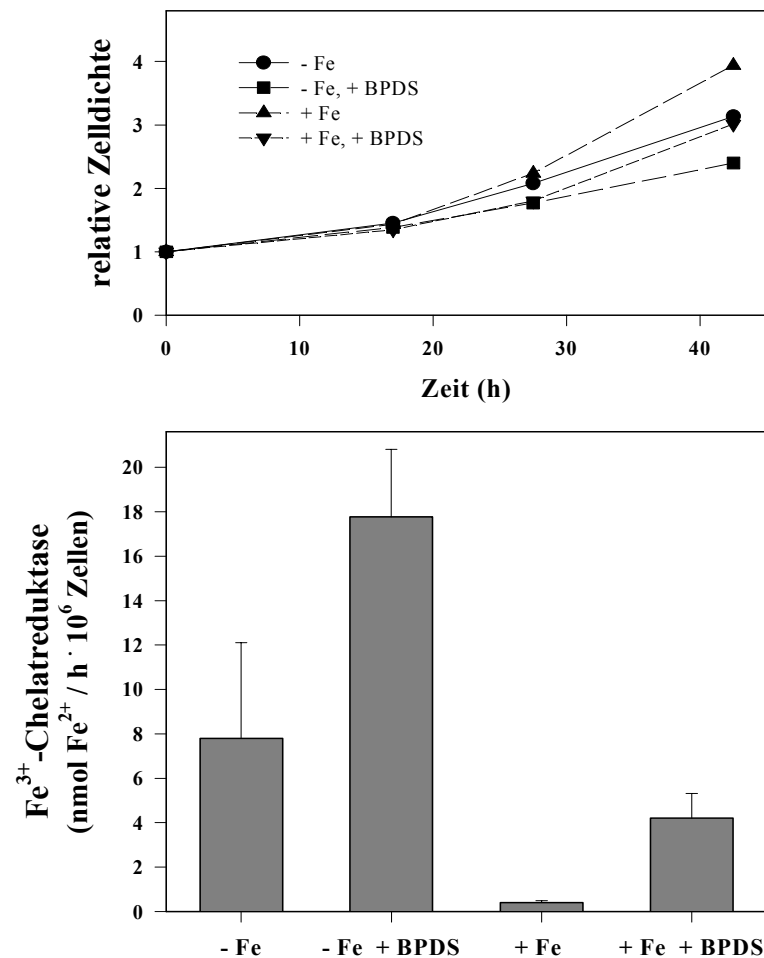


Abb. 32: Einfluß des Fe^{2+} -spezifischen Chelators BPDS auf das Wachstum und die Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität eisengehungelter und eisensuffizienter *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen. Die Algen wurden zwei Tage lang mit und ohne Fe sowie mit und ohne Zusatz von 50 μM BPDS kultiviert. Ihre Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität wurde nach 17 und 27 Stunden gemessen. Die Mittelwerte von zwei Messungen sind gezeigt.

Die Algen wurden zwei Tage lang mit und ohne Fe (ca. 17 μM) in Gegenwart oder Abwesenheit

des Fe^{2+} -Chelators BPDS (50 μM) herangezogen. Dabei zeigte sich, daß BPDS die Effekte des Fe-Mangels verstärkt und sogar selbst Fe-Mangelsymptome hervorrufen kann, wenn genügend Eisen vorhanden ist (Abb. 32).

Eisengehungerte Algen wiesen etwa zehnfach erhöhte Reduktaseaktivität verglichen mit den eisensuffizienten Algen auf. In Anwesenheit von BPDS erhöhte sich diese Aktivität noch etwa zweifach. Die eisensuffizienten Algen mit BPDS zeigten ebenfalls stärkere Fe^{3+} -Reduktion. Diese Daten deuten auf eine Rolle der Fe^{3+} -Chelatreduktase in der Eisenaufnahme hin.

3.11 Fe-Transportaktivität der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii*

3.11.1 Induktion des Fe-Transports unter Eisenmangel

Um die Frage zu klären, ob die Reduktion von Fe^{3+} obligatorisch für die Eisenaufnahme in *C. reinhardtii* ist, wurde die Aufnahme von radioaktivem Fe gemessen (Abb. 33). Dazu wurde zunächst ein Meßsystem erarbeitet (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998). Es ist an die Transportstudien in Hefezellen angelehnt, mußte jedoch in Bezug auf die Pufferbedingungen, den Abstand der Meßpunkte, die Filtermembran, die Substratkonzentration und den Wachstumszustand der Zellen modifiziert werden (2.2.5).

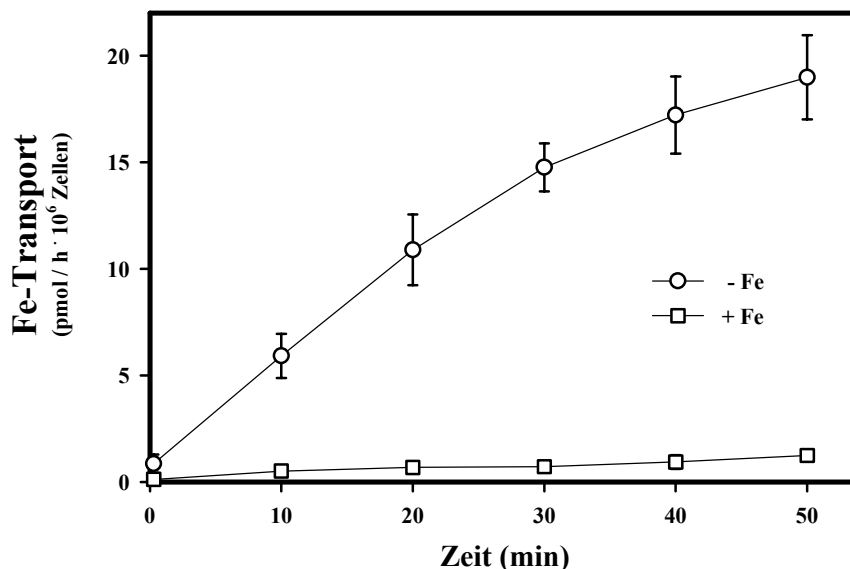


Abb. 33: Aufnahme radioaktiv markierten Eisens in *Chlamydomonas reinhardtii*. Exponentiell wachsende Algen wurden für 40 Stunden in TAP-Medium mit und ohne Eisen herangezogen, bevor die Aufnahme von $1 \mu\text{M}$ ^{59}Fe -HEDTA gemessen wurde. Die Kontrollwerte auf Eis sind abgezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten sind gezeigt.

Die Fe-Transportraten eisensuffizienter *Chlamydomonas*-Zellen waren gering (etwa $1 \text{ pmol} / \text{h} \cdot 10^6$ Zellen). Nur in Fe-gehungerten *Chlamydomonas*-Kulturen konnten deutliche Fe-Transportraten von etwa $20 - 22 \text{ pmol} / \text{h} \cdot 10^6$ Zellen gemessen werden (Abb. 33). Auf Eis wurde kaum Fe-Transport gemessen, was darauf hinweist, daß der Fe-Transport ein enzymatischer Prozeß ist.

Abb. 33 zeigt die Eisenaufnahme eisengehungelter und eisensuffizienter Algen. Lineare Transportraten konnten über mindestens 30 Minuten gemessen werden.

3.11.2 Valenz des transportierten Eisens

In höheren Pflanzen, mit Ausnahme der Gräser, ist die Reduktion von Fe^{3+} Voraussetzung für den Fe-Transport. Die Alge *Chlamydomonas reinhardtii* hatte unter Fe-Defizienz stark erhöhte Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität gezeigt, was auf einen ähnlichen Mechanismus schließen läßt (3.10.3). Der Fe^{2+} -spezifische Chelator BPDS im Wachstumsmedium führte zu erhöhter Fe^{3+} -Chelatreduktase, was ebenfalls darauf hinweist, daß Fe^{2+} , nicht Fe^{3+} transportiert wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden die Fe-Aufnahmestudien mit Fe^{2+} in Gegenwart eines großen Überschusses an Ascorbat durchgeführt. Tabelle 6 zeigt den direkten Vergleich von Fe^{3+} -Reduktase und Fe-Transport, wobei Fe^{2+} oder Fe^{3+} als Substrat angeboten wurde.

Tabelle 6: Vergleich der Fe^{3+} -Chelatreduktase mit den Fe-Transportraten in *Chlamydomonas reinhardtii*.

Die Zellen wurden zwei Tage lang in TAP-Medium mit und ohne Fe herangezogen, bevor ihre Fe^{3+} -Chelatreduktase und die Aufnahme von radioaktiv markiertem Fe gemessen wurde. Dabei wurde 1 μM Fe^{3+} -HEDTA oder 1 μM Fe^{2+} -HEDTA in Gegenwart von 16,7 μM Ascorbat angeboten.

Anzuchts- bedingungen	Fe^{3+} -Chelatreduktase (nmol / h · 10 ⁶ Zellen)	Fe-Transport (pmol / h · 10 ⁶ Zellen)	
		Fe^{3+} -HEDTA	Fe^{2+} -Ascorbat
+ Fe	0,9 ± 0,2	0,9	1,9
– Fe	14,9 ± 4,8	21,1	34,7

Der Transport von Fe^{2+} war gegenüber dem von Fe^{3+} etwa 1,5 bis 2-fach erhöht. Obwohl diese Unterschiede gering sind, legen diese Meßdaten den Schluß nahe, daß Fe^{2+} und nicht Fe^{3+} in *Chlamydomonas reinhardtii* Substrat für den Transporter ist. Die relativ hohen Transportraten von Fe^{3+} -HEDTA (etwa 2/3 der Raten von Fe^{2+} -Ascorbat) waren vermutlich auf die starke Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität zurückzuführen.

3.11.3 Inhibition der Fe-Aufnahme

Die Aufnahme von Kationen in pflanzliche Zellen erfolgt entlang des Membranpotentials (MARSCHNER 1986). Um einen Einblick in den Transportmechanismus zu erlangen, wurden die Zellen jeweils 5 Minuten vor der Aufnahmemessung mit dem Sulfhydrylreagenz PCMBs und dem Protonophor FCCP versetzt. Während PCMBs keinen Einfluß auf den Fe-Transport hatte, wurde er bereits durch 20 μM FCCP komplett inhibiert. Die Erhöhung des pH-Wertes von 6,0 auf

7,0 durch Zugabe von Tris bewirkte knapp 20 % Inhibition des Fe-Transportes (Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluß verschiedener Reagenzien auf den Fe^{2+} -Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Zellen wurden zwei Tage lang in TAP-Medium ohne Fe herangezogen bevor die Aufnahme von Fe^{2+} in Gegenwart von Ascorbat gemessen wurde (n = 3).

Behandlung	Konzentration	Fe^{2+} -Aufnahme	
		pmol / h · 10 ⁶ Zellen	% der Kontrolle
Kontrolle (5 % DMSO)	-	32,2 ± 2,6	100
FCCP in 5 % DMSO	20 µM	0,8 ± 0,5	2,5
PCMBS in 5 % DMSO	100 µM	33,0 ± 7,2	102,5
Tris	ca. 1,5 mM	26,1 ± 5,7	81,2

Die Spezifität des Fe^{2+} -Transportes wurde durch Kompetitionsstudien mit einem 100-fachen Überschuß an divalenten Kationen analysiert. Dabei wurden Lösungen der angegebenen Metallsalze unmittelbar nach der Substratzugabe zu den Zellen pipettiert.

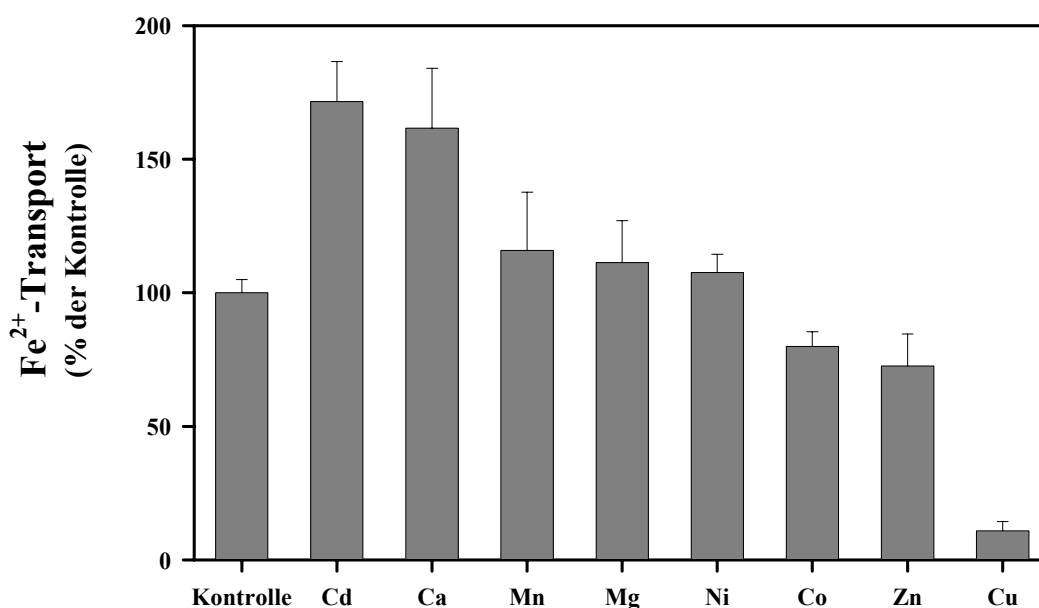


Abb. 34: Einfluß divalenter Metallionen auf den Fe-Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. Eisengehungerte Zellen wurden zu Fe-Transportmessungen herangezogen. Dabei wurde 1 µM radioaktives Fe^{2+} in Gegenwart von Ascorbat als Substrat eingesetzt, und 100 µM der angegebenen Metallsalze wurden unmittelbar nach Substratzugabe zu den Zellen pipettiert (n = 3).

Als einziges Metall war Kupfer in der Lage, den Eisentransport deutlich zu inhibieren. Geringe Inhibitionen wurden auch durch Kobalt und Zink beobachtet (Abb. 34).

Die Inhibition des Fe^{2+} -Transportes durch Cu wurde konzentrationsabhängig untersucht. Dabei wurde $1\ \mu\text{M}$ Fe^{2+} bei CuSO_4 -Konzentrationen von null bis $50\ \mu\text{M}$ eingesetzt. In diesen Versuchen erwies sich die Inhibition als konzentrationsabhängig mit einer halbmaximalen Inhibition bei etwa $10\ \mu\text{M}$ (Abb. 35).

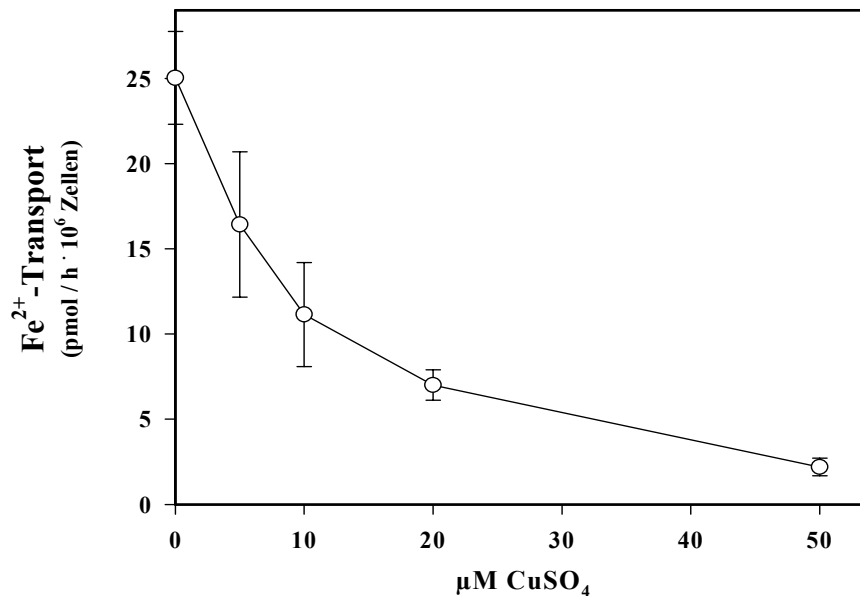


Abb. 35: Einfluß von Kupfer auf den Fe^{2+} -Transport in eisengehungerte *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen. $1\ \mu\text{M}$ radioaktiv markiertes Fe^{2+} wurde als Substrat angeboten und die angegebenen Kupferkonzentrationen wurden unmittelbar nach der Substratzugabe zu den Zellen pipettiert (n = 3).

3.12 Interaktionen des Fe- und des Cu-Stoffwechsels in *Chlamydomonas reinhardtii*

Verschiedene Beobachtungen verknüpfen den Kupfer- mit dem Eisenstoffwechsel: Cu-defizient ernährte Schweine waren gleichzeitig anämisch, was durch die mangelnde Funktion des kupferhaltigen Serumproteins Ceruloplasmin und aufgrunddessen mit der gestörten Beladung von Transferrin mit Fe erklärt wurde (VULPE UND PACKMAN 1995). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der Fe-Stoffwechsel ebenfalls an die Cu-Assimilation gekoppelt. Mutationen in den Cu-Transportergenen *CTR1*, *ATX1* und *CCC2* verhinderten den Transport von Cu in das Endomembransystem und damit die Beladung des Fet3-Proteins mit Cu. Dies führte zum Ausfall des hochaffinen Fe-Transportsystems bestehend aus der Cu-haltigen Fe-Oxidase Fet3p und dem

Fe-Transporter Ftr1p (EIDE 1998). Patienten mit den genetisch bedingten „Wilson’s“- oder „Menkes“-Krankheiten weisen neurodegenerative Defekte auf. Bei ihnen sind kupfertransportierende ATPasen betroffen (VULPE UND PACKMAN 1995).

In Erbsenwurzeln wurde gezeigt, daß Cu-Defizienz zu erhöhter Fe^{3+} -Chelatreduktase führte und umgekehrt (WELCH *et al.* 1993). Schließlich wurde spekuliert, daß in Hefe und in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ zur Assimilation von Cu notwendig sei (HASSETT UND KOSMAN 1995, HILL *et al.* 1996). In höheren Pflanzen gibt es widersprüchliche Meinungen zu dieser Hypothese (WELCH *et al.* 1993, COHEN *et al.* 1997, HOLDEN *et al.* 1991, HOLDEN *et al.* 1995).

Kupfer hatte den Fe-Transport in *Chlamydomonas reinhardtii* signifikant und konzentrationsabhängig inhibiert (3.11.3). Es wurde daher untersucht, ob sich die Fe^{3+} -Chelatreduktase und die Cu^{2+} -Reduktase (Tabelle 8) oder der Fe-Transport (Abb. 36) in Abhängigkeit der Kupferernährung unterschieden.

Tabelle 8: Interaktionen der Fe^{3+} - und der Cu^{2+} -Reduktaseaktivität in *Chlamydomonas reinhardtii*: Die Algen wurden bis zur spät-exponentiellen Phase herangezogen, gewaschen und dann in TAP-Medium mit und ohne Fe oder Cu kultiviert. Nach zwei oder drei Tagen wurden die Fe^{3+} - und die Cu^{2+} -Reduktaseaktivitäten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten sind gezeigt.

Behandlung	<u>Cu^{2+}-Reduktase</u>		<u>Fe^{3+}-Reduktase</u>	
	nmol Cu^+ / h · 10 ⁶ Zellen	% der Kontrolle	nmol Fe^{2+} / h · 10 ⁶ Zellen	% der Kontrolle
+ Fe, + Cu	1,2 ± 0,4	100	1,1 ± 0,1	100
– Fe, + Cu	1,9 ± 0,2	160	30,6 ± 9,8	2756
+ Fe, – Cu	1,4 ± 0,1	123	1,3 ± 0,4	118
– Fe, – Cu	2,3 ± 0,4	193	19,6 ± 5,1	1768

Die in Tabelle 8 dargestellten Daten zeigen, daß die Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii* im wesentlichen von der Fe-Ernährung und nur kaum von der Cu-Ernährung abhängt. Die Cu-Reduktaseaktivität wird durch Cu-Defizienz und durch Fe-Defizienz induziert, wobei die Fe-Defizienz einen stärkeren Anteil hat.

Die Fe^{2+} -Aufnahme in eisengehungerte *C. reinhardtii*-Zellen war durch Cu inhibiert worden. Dies führte zu der Frage, ob der Fe-Transporter auch Cu transportiert. Sollten Fe und Cu denselben Transporter benutzen, so wäre zu erwarten, daß dieser Transporter auch durch Cu-Mangel induziert wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Fe-Transport in Abhängigkeit der Fe- und der Cu-Ernährung gemessen. Die Zeit des Fe-Mangels betrug dabei 1,5 Tage, die des Cu-

Mangels 3,5 Tage und die des Fe- und Cu-Mangels ebenfalls 3,5 Tage.

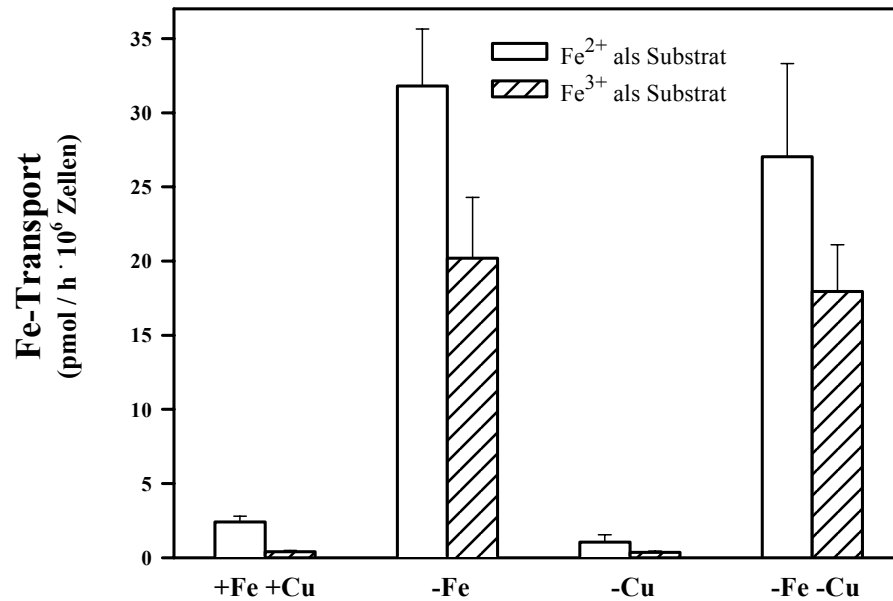


Abb. 36: Einfluß der Fe- und der Cu-Ernährung auf den Fe-Transport von *Chlamydomonas reinhardtii*.

Abb. 36 zeigt, daß Cu-Mangel keinen signifikanten Einfluß auf die Fe-Aufnahme in *Chlamydomonas reinhardtii* hatte. Die durch Fe-Defizienz hervorgerufene Induktion des Fe-Transportes konnte durch Cu-Defizienz nicht gesteigert werden. Auch Cu-Mangel allein hatte auf die Transportaktivität kaum Effekt.

Der inhibitorische Effekt von Cu auf den Fe-Transport wurde näher untersucht. Dabei wurde in Fe²⁺-Transportstudien bei konstanten Cu-Konzentrationen die Substratkonzentration variiert. Abb. 37 zeigt den Einfluß von 20 µM Cu auf die Substratsättigung der Fe-Aufnahme. Es konnte keine Konkurrenz der Fe-Aufnahme durch Cu gemessen werden. Stattdessen war der inhibitorische Effekt von Cu auf geringe Fe-Konzentrationen beschränkt. Bei höheren Fe-Konzentrationen zeigte sich sogar ein stimulierender Effekt von Cu auf den Fe-Transport. Diese Daten führten zu der Auffassung, daß in *Chlamydomonas reinhardtii* mehrere Fe-Transportsysteme existieren, von denen das hochaffine System durch Cu inhibierbar ist. Selbst bei 200 µM Fe²⁺ war die Aufnahme nicht vollständig gesättigt (Daten nicht gezeigt).

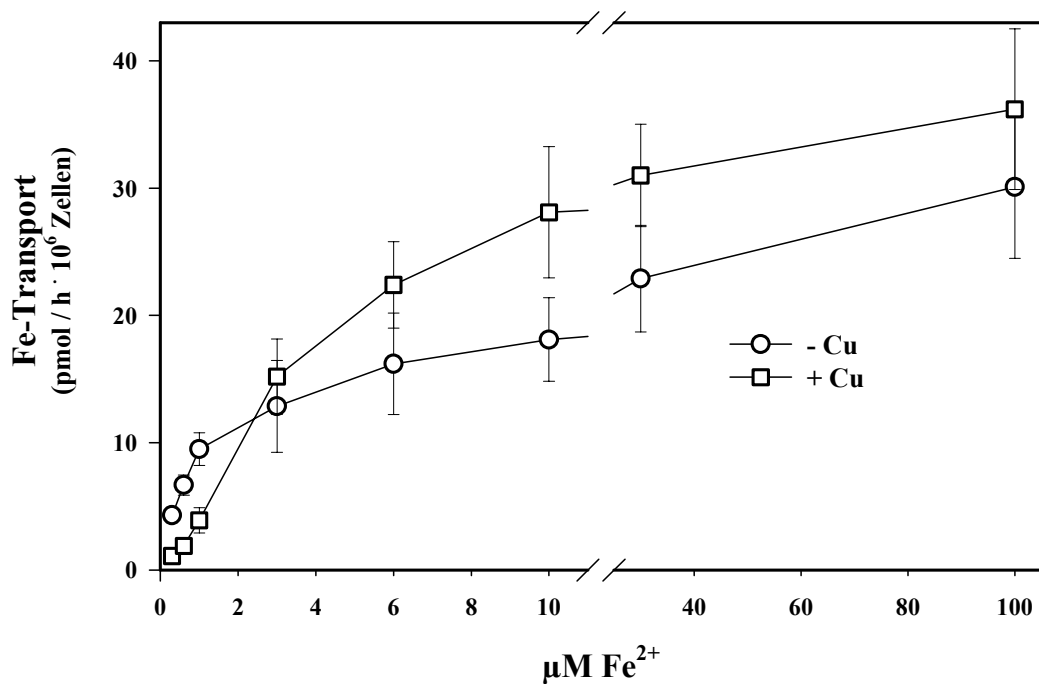


Abb. 37: Effekt von 20 $\mu\text{M CuSO}_4$ auf die Sättigung des Fe^{2+} -Transportes in *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Algen wurden zwei Tage lang ohne Fe herangezogen, bevor ihre Fe-Transportaktivität gemessen wurde. Als Substrat wurde radioaktiv markiertes FeCl_2 in Konzentrationen zwischen 0,3 und 200 μM in Gegenwart eines 16,7-fachen Überschusses an Ascorbat eingesetzt. Eine CuSO_4 -Lösung (+ Cu, Quadrate) oder Uptake-Puffer (- Cu, Kreise) wurde unmittelbar nach der Substratzugabe zu den Zellen pipettiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei Experimenten. Ähnliche Effekte wurden auch bei 10 und 50 $\mu\text{M CuSO}_4$ beobachtet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen der Fe-Assimilation in Tomaten auf molekularer Ebene und in der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* auf physiologischer Ebene durchgeführt. Obwohl Fe-Defizienz ein erstzunehmendes Problem in der Landwirtschaft darstellt, wurde der Fe-Transport auf molekularer Ebene bisher nur in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* beschrieben (EIDE *et al.* 1996). Dies ist der erste Bericht über die Charakterisierung von Fe-Transportern aus Ertragspflanzen (ECKHARDT *et al.* 2000). Er könnte zu einer Verbesserung der Eiseneffizienz in Tomaten durch molekulare Pflanzenzüchtung beitragen.

Die Fe^{3+} -Chelatreduktase höherer Pflanzen war zu Beginn dieser Arbeit auf molekularer Ebene nicht bekannt. Es war jedoch abzusehen, daß Methoden wie zweidimensionale Gelelektrophorese oder differentielles *Screening* in dieser Frage nicht zum Ziel führten (HERBIK *et al.* 1996, GIRITCH *et al.* 1997, SCHMIDT UND BUCKHOUT 1997, H. Bäumlein, pers. Mitt.). Daher wurde mit der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* ein neuer Modellorganismus zur Untersuchung der Fe-Assimilation etabliert.

4.1 Molekulare Charakterisierung des Fe-Transportes in Tomaten

Seit den grundlegenden Arbeiten von MINET *et al.* 1992 hat sich die Komplementation von Hefemutanten als ausgezeichnetes Werkzeug zur Isolation pflanzlicher cDNAs bewährt. In vielen Fällen konnte das in Hefe exprimierte Protein physiologisch charakterisiert werden. Dabei darf nicht vergessen werden, daß Hefen keine Pflanzen sind und daher die physiologischen Eigenschaften nur als „apparent“ betrachtet werden können. Dennoch haben sich die in Hefe gemessenen Daten in vielen Fällen als physiologisch sinnvoll bewährt und ließen sich gut mit den in Pflanzen gemessenen Daten vergleichen (PENCE *et al.* 2000).

Basierend auf dem Plasmid pFL61 (MINET *et al.* 1992) wurden die Hefe-Expressionsplasmide pUE1 und pUE2 konstruiert. Sie ermöglichen in Hefe die konstitutive Genexpression unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors und erlauben vielfältige Klonierungsmöglichkeiten, da sie zwischen dem Promotor und dem Terminator über sechs singuläre Restriktionschnittstellen verfügen (Abb. 7). Diese Plasmide wurden zur Expression pflanzlicher cDNAs in Hefe verwendet, was ihre Funktionalität deutlich macht. Eine cDNA-Bank wurde aus der Wurzel-mRNA fünf Tage lang eisengehungelter Tomatenpflanzen konstruiert. Diese Bank erwies sich als außerordentlich groß und komplex (Abb. 11). Außerdem wurde der Hefestamm AMY43 ($\Delta\text{ftr1}::\text{LEU2}$) konstruiert, der im hoch-, aber nicht im niedrigaffinen Fe-Transport defizient ist (Abb. 8, Abb. 9, MAS MARQUES 1998). Die Hefemutante, die Expressionsplasmide und die cDNA-Bank stehen nun der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung.

Isolierung zweier putativer Fe-Transporter

Durch Hybridisierung mit der *IRT1*-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* konnten aus der Tomatenwurzels-cDNA-Bank zwei cDNAs (*LeIRT1* und *LeIRT2*) isoliert werden, die den Wachstumsdefekt eisentransportdefizienter Hefemutanten komplementieren. Die vorliegenden Daten legen den Schluß nahe, daß es sich bei *LeIRT1* und *LeIRT2* um Fe-Transporter handelt. Insbesondere die Suppression des Wachstumsdefektes der Hefemutanten DEY1453 (*fet3*, *fet4*) und AMY43 (*ftr1*) auf eisenlimitierendem Medium und die im Stamm DEY1453 nachgewiesene Fe-Transportaktivität befürworten diese Auffassung. Außerdem wurden für *LeIRT1* erhöhte mRNA-Level unter Fe-Mangel nachgewiesen, was für eine physiologische Rolle im Fe-Transport spricht.

Physiologie des *LeIRT*-vermittelten Fe-Transports

Die Funktion der isolierten cDNA-Klone konnte durch die Komplementation der Hefemutante DEY1453 überprüft und kinetische Parameter konnten in Hefe gemessen werden. Sowohl der *LeIRT1*- als auch der *LeIRT2*-vermittelte Fe-Transport waren temperaturabhängig und sättigbar (Abb. 19). In Übereinstimmung mit den grundlegenden Beobachtungen von CHANEY *et al.* 1972 bevorzugte der *LeIRT*-vermittelte Fe-Transport Fe^{2+} und nicht Fe^{3+} als Substrat. Dieser Mechanismus wurde in allen bisher untersuchten Pflanzen mit Ausnahme der Gräser gefunden und als „Strategie I“ bezeichnet (BIENFAIT 1988). Der dabei geschwindigkeitsbestimmende Schritt, Fe^{3+} -Reduktion oder Fe^{2+} -Transport variierte mit der untersuchten Art (GRUSAK *et al.* 1990).

Obwohl auch mit leerem Plasmid transformierte *fet3fet4*-Hefezellen bei hohen Fe-Konzentrationen deutlichen Fe-Transport zeigten, lag dieser erheblich unter dem der mit *LeIRT1* und *LeIRT2* transformierten Zellen. Zudem war dieser Transport selbst bei 100 μM Fe^{2+} nicht gesättigt. Diese verbliebene Fe-Transportaktivität kann auf Metalltransportsysteme zurückgeführt werden, die von Fet4p und dem hochaffinen Fet3p/Ftr1p-Komplex unabhängig sind, beispielsweise die der *Nramp*-Proteine (EIDE 1998). Da sie keine Sättigungskinetik zeigte, wurde diese Fe-Transportaktivität als unspezifisch angesehen. Die in Hefe gemessenen, apparenten K_m -Werte der *LeIRT*-Proteine für Fe^{2+} lagen unter 1 μM , was etwas niedriger ist, als die im gleichen Stamm gemessenen K_m -Werte von *IRT1* aus *Arabidopsis* ($6 \pm 1 \mu\text{M}$; EIDE *et al.* 1996). Diese Konzentrationen liegen im physiologischen Bereich, wenn man den Fe-Bedarf höherer Pflanzen berücksichtigt (EPSTEIN 1972). Verglichen mit *IRT1* vermitteln *LeIRT1* und *LeIRT2* hochaffinen Fe^{2+} -Transport.

In verschiedenen Studien wurde berichtet, daß in Pflanzen unter Fe-limitiertem Wachstum oder in Mutanten mit gestörter Fe-Assimilation der Gehalt an divalenten Metallionen, speziell Mn^{2+} und Zn^{2+} , in den Sprossen ansteigt (WELCH *et al.* 1993; YI UND GUERINOT 1996; DELHAIZE 1996; SCHOLZ *et al.* 1985). Diese Beobachtung könnte erklärt werden, wenn der Fe-Transport, der unter Fe-defizienten Bedingungen induziert wird, wenig spezifisch ist. Der *LeIRT1*- und *LeIRT2*-vermittelte Fe^{2+} -Transport konnte in Kompetitionsstudien durch einen 100-fachen Überschuß der Übergangsmetalle Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} , aber nicht durch die Erdalkalimetalle

Ca^{2+} , Mg^{2+} und Sr^{2+} , inhibiert werden. Genauere Untersuchungen mit nur einem 10-fachen Überschuß bestätigten die inhibitorischen Effekte von Ni^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} (Abb. 20). Mit Mn^{2+} konnte nur eine geringe Fe^{2+} -Transportinhibition gemessen werden. Die Effekte von Cu^{2+} und Co^{2+} waren komplex, da mit ihnen keine linearen Fe-Transportkurven gemessen wurden. Es ist unwahrscheinlich, daß die Inhibition des Fe-Transportes durch Ni^{2+} , Zn^{2+} und Cd^{2+} auf Metall-Toxizität beruht, da in einer ähnlichen Studie gezeigt wurde, daß selbst 500 μM Co oder Cd über einen Zeitraum von 15 Minuten keinen Einfluß auf die Viabilität von Hefezellen hatten (DIX *et al.* 1994).

Neben der Inhibition des Fe-Transportes durch divalente Metallionen führte eine zweite Evidenzlinie zu der Auffassung, daß die LeIRT-Proteine wenig spezifischen Metalltransport vermitteln: die Komplementation von Mn-, Zn-, und Cu-Transportmutanten. Sowohl LeIRT1 als auch LeIRT2 waren in der Lage, den Wachstumsdefekt von Mn-, Zn-, und Cu-Transportmutanten zu supprimieren (Abb. 21). In einer Suche nach Mn-Transportern wurde IRT1 aus *Arabidopsis* zum zweitenmal isoliert (KORSHUNOVA *et al.* 1999). Genauere Untersuchungen zeigten, daß IRT1 eine Mn- und eine Zn-, aber nicht eine Cu-Transportmutante komplementierten. Außerdem wurden IRT1-vermittelte Mn- und Zn-Transportaktivitäten nachgewiesen (KORSHUNOVA *et al.* 1999). Dies bekräftigt die Vorstellung, daß die Fe-Transporter aus Tomaten und *Arabidopsis* eher unspezifischen Metalltransport vermitteln. Sie unterscheiden sich allerdings im Bezug auf den Cu-Transport.

Wie bei IRT1 wurde der LeIRT-vermittelte Fe^{2+} -Transport auch durch Zn^{2+} und Cd^{2+} inhibiert. In *Arabidopsis* schien Zn^{2+} sogar mit höherer Affinität transportiert zu werden als Fe^{2+} , da der apparente K_m -Wert für Fe^{2+} etwa doppelt so hoch war wie der für Zn^{2+} während die v_{max} -Werte ähnlich waren (EIDE *et al.* 1996, KORSHUNOVA *et al.* 1999). Obwohl keine direkte Evidenz vorliegt, deuten diese Daten darauf hin, daß LeIRT1 und LeIRT2 auch Zn^{2+} transportieren. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Untersuchung durch direkte Zn-Transportmessungen.

Obwohl für Cd keine essentielle Funktion in irgendeinem Organismus bekannt ist, wurde Cd-Transport in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen (PENCE *et al.* 2000). Er erfolgt wahrscheinlich aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit Zn. In Fe-defizienten Erbsenpflanzen wurde erhöhte Cd-Aufnahme gemessen (COHEN *et al.* 1998). Außerdem erwiesen sich transgene *Arabidopsis*-Pflanzen (M.L. Guerinot, pers. Mitt.) und Hefen (D. Eide, pers. Mitt.), die das IRT1-Protein überexprimierten, als hypersensitiv gegenüber Cd in ihrer Nährlösung. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Inhibition des Fe-Transportes durch Cd außerhalb der Zelle erfolgt. In LeIRT1 und LeIRT2 wurden je vier Cysteinreste gefunden, deren Position in extrazellulären Regionen vorausgesagt wurde und die potentielle Angriffspunkte für Cd darstellen (LeIRT1: Cys 30, 38, 113 und 223; LeIRT2: Cys 30, 38, 113 und 225). Cys 113 ist hochkonserviert (Abb. 15). Diese Cysteine wären eine lohnendes Objekt für ortsgerichtete Mutagenese. Das Hefe-System macht es leicht, den Einfluß von Cystein-Mutanten im Vergleich zu ihren Wildtyp-Allelen zu messen. In Versuchen mit sulfhydrylreaktiven Reagenzien konnten jedoch keine inhibitorischen Effekte auf den LeIRT-vermittelten Fe-Transport beobachtet werden (nicht gezeigt). Dies spricht gegen eine Beteiligung der extrazellulären Cysteine im Fe-Transport

und unterstützt die Vermutung, daß Cd durch die LeIRT-Proteine transportiert wird.

In einem kürzlich erschienenen Bericht wurde die Rolle von IRT1 im Cd-Transport in *Arabidopsis thaliana* bezweifelt und stattdessen eine Rolle von Proteinen der *Nramp*-Familie im Fe- und Cd-Transport vorgeschlagen (THOMINE *et al.* 2000). Diese Proteine komplementierten eine *fet3,fet4*-Hefemutante und die Transkriptmenge zweier der drei Gene war eisenmangelinduziert. Dennoch erscheinen die präsentierten Daten zum Fe-, und erst recht zum Cd-Transport als spekulativ. Die vorgestellten Fe-Transportstudien beschränken sich auf zwei Meßpunkte. Statt Cd-Transport wurden nur Cd-Gehalte transformierter Hefen gemessen und es wurden Cd-Sensitivitätstests in Hefe durchgeführt. Die Resistenz oder Sensitivität gegenüber Schwermetallen kann jedoch auf einer Reihe von Mechanismen beruhen und muß keineswegs nur durch den Aufnahmetransporter reguliert sein (WILLIAMS *et al.* 2000). In Pflanzen bezogen sich die Schlußfolgerungen auf die bestenfalls 30 % größere Wurzellänge einer entsprechenden *Arabidopsis*-Mutante und die höchstens 20 % kürzere Wurzellänge der Überexpressionspflanzen in Gegenwart von 1 μM Cd^{2+} (beides ein Unterschied von unter 5 mm; THOMINE *et al.* 2000). Es erscheint denkbar, daß sowohl die ZIP-Proteine als auch die *Nramp*-Proteine wenig spezifische Metall-Transportaktivitäten verleihen.

Interessanterweise wurde der LeIRT-vermittelte Fe-Transport effizient durch Ni^{2+} inhibiert. Die Inhibition des LeIRT-abhängigen Fe-Transportes durch Ni^{2+} kann durch unspezifischen Transport erklärt werden. Es ist denkbar, daß die Fe-Transporter Ni^{2+} transportieren, wenn ihre physiologischen Substrate nicht vorhanden sind. Ähnliche Effekte wurden bisher in keiner anderen Pflanze gefunden. Nickel wurde erst kürzlich als essentielles Spurenelement für Pflanzen beschrieben, und zwar als Cofaktor von Ureasen (ZONIA *et al.* 1995). Ni-Transporter sind in Pflanzen bisher nicht bekannt. Lediglich eine Spaltheife-Mutante, die im *Nic1*-Gen defizient ist, war nicht in der Lage, Ni^{2+} spezifisch zu transportieren, obwohl in hohen Konzentrationen Ni^{2+} durch Mg^{2+} -Aufnahmesysteme transportiert wurde (EITINGER *et al.* 2000). Das Nic1-Protein wurde als Ni^{2+} -Transporter beschrieben, der mit sehr hohen Affinitäten arbeitet ($K_m < 50$ nM; O. Degen und T. Eitinger, pers. Mitt.). Der LeIRT-vermittelte Transport von Ni^{2+} ist eine interessante Frage, die in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Eitinger (Mikrobiologie, Humboldt-Universität) analysiert werden kann.

Der inhibitorische Effekt von Mn^{2+} auf den LeIRT-vermittelten Fe^{2+} -Transport war bei einem 100-fachen Überschuß an Mn deutlich, bei einem zehnfachen Überschuß jedoch nur gering. Dennoch legt die Komplementation einer Mn-Transportmutante (Δsmf1) den Schluß nahe, daß die LeIRT-Proteine auch Mn-Aufnahme in die Zellen vermittelten. Die geringe Inhibition könnte eine geringere Affinität von Mn^{2+} gegenüber Fe^{2+} widerspiegeln. Der Mn^{2+} -Transport würde dann erst bei höheren Mn-Konzentrationen eine signifikante Rolle spielen.

Auch das Wachstum der Cu-Transportmutante 64p wurde durch die LeIRT-Proteine (Abb. 21), aber nicht durch IRT1 aus *Arabidopsis* komplementiert (KORSHUNOVA *et al.* 1999). Der Effekt von Cu auf den Fe-Transport bei einem 100-fachen Überschuß war inhibitorisch. Bei geringen Cu-Konzentrationen war er komplex: die Cu-Ionen bewirkten offenbar eine schnelle, unspezifische Bindung von Fe^{2+} an die Zelloberfläche, wie aus den ebenfalls erhöhten Raten auf Eis

hervorging, denen geringe Fe-Transportraten folgten (Daten nicht gezeigt). Dieser Effekt war durch die LeIRT-Proteine vermittelt. Er trat in den mit leerem Plasmid transformierten Kontrollzellen nicht auf. Diese Daten weisen auf eine Beteiligung der LeIRT-Proteine an der Kupferaufnahme hin, der Mechanismus scheint sich jedoch von dem des Fe-Transportes grundlegend zu unterscheiden. Die direkte Messung des Cu-Transportes ist eine interessante aber schwierige Aufgabe, da das einzige, kommerziell erhältliche Cu-Isotop ^{64}Cu eine Halbwertszeit von nur etwa 12 Stunden hat.

Ein Vergleich der Ionenradien der transportierten und nicht transportierten Metalle konnte nicht zur Klärung des Transportmechanismus beitragen. Durch die Beteiligung von d-Elektronen in der Hülle der Übergangsmetallionen liegen ihre Radien in einem engen Bereich von 69 (Fe^{3+} , oktaedrisch, low spin) - 92 pm (Cd^{2+} , tetragonal). Dies ist signifikant kleiner als die Radien der Erdalkalimetalle Ca^{2+} und Sr^{2+} . Mg^{2+} -Transport wurde bisher für keins der ZIP-Proteine gefunden, obwohl sein Ionenradius mit 86 pm im Bereich der Übergangsmetalle liegt. Offenbar kann die Transportspezifität der einzelnen Metallionen nicht durch ihre Größe erklärt werden. Weiterhin bleibt offen, ob die Hydrathülle der Metallionen beim Transport abgestreift wird oder erhalten bleibt. Die Metalltransportspezifität der ZIP-Proteine wird durch die cytosolischen Histidin-Reste der „variablen Domäne“ bestimmt. Der Austausch einzelner Histidine in IRT1 führte zum Verlust der Transportaktivität oder zur Änderung der Spezifität (M.L. Guerinot, pers. Mitt.). Vermutlich interagieren die freien Elektronen der Histidin-Stickstoffatome mit den d-Orbitalen der Übergangsmetalle aber nicht mit den p-Orbitalen der Erdalkalimetalle.

Die physiologischen Eigenschaften der LeIRT-Proteine sind in Tabelle 9 zusammengefaßt und mit denen von IRT1 verglichen.

Sequenzanalyse der zwei cDNAs

Die LeIRT-cDNAs enthalten offene Leserahmen von 350 bzw. 352 Aminosäuren. Die daraus abgeleiteten Polypeptide sind hydrophob und haben Sequenzähnlichkeit zu IRT1, weshalb sie als LeIRT1 und LeIRT2 bezeichnet wurden (ECKHARDT *et al.* 2000). Die Hydropathieprofile der LeIRT-Proteine (Abb. 14) weisen neun hydrophobe Domänen aus. Die ersten davon werden als Signalpeptide angesehen, die vermutlich proteolytisch abgespalten werden (SignalP-Analyse; NIELSEN *et al.* 1997). Daraus ergeben sich acht putative Transmembran-(TM)-Domänen.

Tabelle 9: Übersicht über die Eigenschaften der Fe-Transporter aus Tomaten und *Arabidopsis*

	IRT1	LeIRT1	LeIRT2
Induktion durch Fe-Mangel?	ja	ja	nein
Transport von Fe ²⁺ :	nachgewiesen *	nachgewiesen	nachgewiesen
K_m für Fe ²⁺ :	6 µM	0,7 µM	0,8 µM
v_{max} für Fe ²⁺ :	1,9 pmol/min·10 ⁶ Zellen	11 pmol/min·10 ⁶ Zellen	9 pmol/min·10 ⁶ Zellen
Inhibition des Fe ²⁺ -Transportes durch:	Cd, (Zn, Mn)	Zn, Cd, (Mn)	Zn, Cd, (Mn)
Transport von Fe ³⁺ :	unwahrscheinlich *	unwahrscheinlich	unwahrscheinlich
Transport von Zn ²⁺ :	nachgewiesen **	wahrscheinlich	wahrscheinlich
K_m für Zn ²⁺ :	2,8 µM	n. g.	n. g.
v_{max} für Zn ²⁺ :	1,85 pmol/min·10 ⁶ Zellen	n. g.	n. g.
Inhibition des Zn ²⁺ -Transportes durch:	Cu, Fe ³⁺ , Cd, Co, (Mn)	n. g.	n. g.
Transport von Mn ²⁺ :	nachgewiesen **	wahrscheinlich	wahrscheinlich
K_m für Mn ²⁺ :	9 µM	n. g.	n. g.
v_{max} für Mn ²⁺ :	0,4 pmol/min·10 ⁶ Zellen	n. g.	n. g.
Inhibition des Mn ²⁺ -Transportes durch:	Cu, Fe ²⁺ , Cd, Zn	n. g.	n. g.
Komplementation einer Zn-Transportmutante?	ja	ja	ja
Komplementation einer Mn-Transportmutante?	ja	ja	ja
Komplementation einer Cu-Transportmutante?	nein	ja	ja

Referenzen: * EIDE *et al.* 1996; ** KORSHUNOVA *et al.* 1999; n. g. = nicht gemessen.

LeIRT1 und LeIRT2 gehören der kürzlich entdeckten ZIP-Proteinfamilie (*ZRT/IRT-like proteins*) an, die Zink- und Eisentransporter umfaßt (Abb. 15). Diese Proteine sind über das gesamte eukaryotische Reich verteilt, was auf ihre universelle Bedeutung schließen läßt. ZIP-Proteine wurden in Pflanzen, Nematoden, Insekten, Hefen, Mäusen und Menschen gefunden (ENG *et al.*

1998). Fast alle bekannten ZIP-Proteine enthalten acht TM-Domänen. Lediglich einige entfernt ähnliche Proteine wie das *growth arrest-inducible protein* aus Säugern sowie ZIP-Proteine aus *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* weichen von dieser Zahl ab. ENG *et al.* 1998 wiesen eine zwischen allen ZIP-Proteinen konservierte, 15 Aminosäuren lange Signatur-Sequenz aus. Diese wurde auch in LeIRT1 und LeIRT2 gefunden (Abb. 15, Abb. 38). Der Sequenzbereich aller ZIP-Proteine zwischen der dritten und der vierten TM-Domäne weist hohe Variabilität auf. Er wurde als die „variable Region“ bezeichnet (ENG *et al.* 1998). Diese Region ist vermutlich cytosolisch (TopPred-Analyse, CLAROS UND V. HEIJNE 1994) und sie enthält eine histidinreiche Domäne. In IRT1 aus *Arabidopsis* erwiesen sich diese Histidine als verantwortlich für die Substraterkennung und -spezifität (M.L. Gueriot, pers. Mitt.). Weiterhin enthalten alle ZIP-Proteine hochkonservierte Histidin-Reste in der 2., 4. und 5. TM-Domäne. Diese Histidine sind Teile amphipatischer Helices. Auch ihnen wurde eine Rolle im Metalltransport zugesprochen (ENG *et al.* 1998). Möglicherweise sitzen diese Histidinreste, zusammen mit denen der „variablen Region“, an der Innenseite eines hydrophilen Kanals, durch den die Metallionen transportiert werden. Histidinreiche Domänen wurden auch in Zink- und Schwermetall-Export-Proteinen gefunden. Dazu gehört das ZAT1-Protein aus *Arabidopsis* (VAN DER ZAAL *et al.* 1999), die mammalischen ZnT-Proteine, Cot1p und Zrc1p aus Hefe und das CzcD-Protein des Bakteriums *Alcaligenes eutrophus*. Diese Proteine vermitteln den Export von Metallen aus der Zelle oder in die Vakuole. Sie gehören der CDF-Familie (*cation diffusion facilitator*) an und haben bis auf die Histidin-Cluster keine Ähnlichkeit mit der ZIP-Familie.

In beiden LeIRT-Sequenzen wurden N-Glycosylierungsstellen gefunden (Abb. 38). Die aminoterminalen Glycosylierungsstellen (N40) sind zwischen LeIRT1 und LeIRT2, aber nicht innerhalb der ZIP-Familie konserviert. Die Glycosylierungsstelle (N222) zwischen der vierten und der fünften TM-Helix ist zwischen LeIRT2 und dem Rest der ZIP-Familie konserviert, findet sich aber nicht in LeIRT1. Außerdem existieren in LeIRT1 und -2 nahe der C-Termini Glycosylierungssignale, deren Glycosylierung jedoch unwahrscheinlich ist, da sie innerhalb einer putativen TM-Helix lokalisiert sind. In Hefe wurde die Glycosylierung des ZRT1-Proteins, eines Mitgliedes der ZIP-Familie, nachgewiesen (GITAN *et al.* 1998). Die insgesamt geringe Konservierung der N-Glycosylierungsstellen läßt eine Rolle der N-Glycosylierung im ZIP-vermittelten Metalltransport als eher unwahrscheinlich erscheinen. Aus den Sequenzdaten wurde ein zusammenfassendes Modell der Membrantopologie erstellt (Abb. 38).

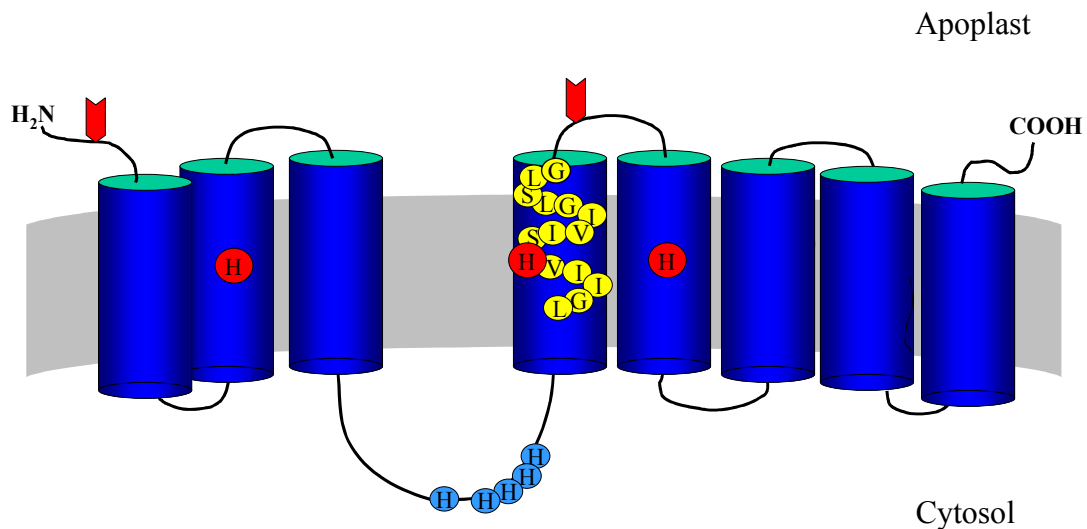


Abb. 38: Modell der aus den Sequenzdaten abgeleiteten Membrantopologie der LeIRT-Proteine. Die blauen Säulen repräsentieren Transmembrandomänen. Die cytosolische, histidinreiche Domäne ist hellblau hervorgehoben. Rote Pfeilspitzen symbolisieren putative N-Glycosylierungsstellen. Die ZIP-Signatur-Sequenz ist in gelb angegeben und die hochkonservierten Histidinreste sind rot eingezeichnet.

Expression der *LeIRT*-Gene

Die Expression der *LeIRT*-Gene wurde auf RNA-Ebene untersucht. In Northern Blot-Analysen wurde die Expression beider Gene in den Wurzeln Fe-gehungerter Tomatenpflanzen nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Kontrollexperimente wiesen aus, daß die beiden Transkripte aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit in Hybridisierungsexperimenten selbst unter stringenten Bedingungen nicht zu unterscheiden waren. Daher wurden, um zwischen den Transkripten der beiden *LeIRT*-Gene zu diskriminieren, halbquantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Diese zeigten, daß die Transkriptmenge von *LeIRT1* in Wurzeln von Tomaten unter Fe-Mangel stark ansteigt, während die von *LeIRT2* offenbar nicht durch den Fe-Ernährungszustand der Pflanzen reguliert ist (Abb. 22). Aufgrund dieser Daten wird angenommen, daß LeIRT1 ein eisenregulierter Metallionentransporter ist, während die Funktion von LeIRT2 vorerst unklar bleibt. Es bleibt zu untersuchen, ob die Transkriptmenge von *LeIRT2* durch andere Metalle reguliert wird (zum Beispiel Zink).

Geringe Transkriptmengen von *LeIRT1* konnten auch in den Blüten acht Wochen alter, vollernährter Tomatenpflanzen nachgewiesen werden (Abb. 22). Die Expression des *LeIRT1*-Gens in Blüten könnte auf einen Metalltransporter hinweisen, der die neugebildeten Samen mit Fe^{2+} oder anderen Metallionen versorgt. Im Lebenszyklus von Erbsen stieg die Fe^{3+} -Chelatreduktase während der Blüte stark an (GRUSAK 1995). Vermutlich stellt dieser Aktivitätsanstieg die Versorgung der sich entwickelnden Samen mit Eisen sicher (GRUSAK 1995). Da Eisen im Xylem als Fe^{3+} -Citrat transportiert wird (MARSCHNER 1986), die LeIRT-Proteine aber Fe^{2+} transportieren, stellt sich die Frage, ob ein weiterer Reduktionsschritt zur Entladung des Xylems notwendig ist. Dafür sprechen auch die bisher nicht verstandenen Fe^{3+} -Chelatreduktasen in Blättern (MOOG UND

BRÜGGEMANN 1994). Kürzlich wurde ein solches Enzym aus Spinatblättern zur Homogenität gereinigt (P. Moog, Frankfurt/M, pers. Mitt.). Zur Überprüfung dieser Hypothese sind detaillierte räumliche und zeitliche Expressionsanalysen der *LeIRT*-Gene durch *in situ*-Hybridisierung oder immunhistochemische Experimente notwendig. Weiterhin muß untersucht werden, ob die *LeIRT1*-Transkriptmenge in Blüten auch durch die Fe-Versorgung der Pflanzen reguliert wird, oder ob die Induktion durch Fe-Mangel auf Wurzeln beschränkt bleibt.

Eine andere Hypothese geht von der Entladung der Xylems durch einen Fe^{3+} -Nicotianamin-Transporter aus. Dieser Vorstellung wurde durch die molekulare Charakterisierung des Phytosiderophor-Rezeptor-Gens (*ysI*) aus Mais neue Nahrung gegeben, da *ysI*-homologe Gene im Genom von *Arabidopsis thaliana* gefunden wurden (Elsbeth L. Walker, Bericht auf dem 10th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants; 14.–19.- Mai 2000, Houston TX). Da *Arabidopsis* eine typische Strategie I-Pflanze ist, deren Fe-Assimilation keine Phytosiderophoren gebraucht, wurde der Transport der chemisch ähnlichen Nicotianamin- Fe^{3+} -Komplexe durch die entsprechenden Genprodukte postuliert. Dieser Hypothese liegen jedoch keinerlei in begutachteten Fachzeitschriften veröffentlichte Daten zugrunde.

In transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen führte die Überexpression eines epitop-markierten IRT1-Proteins unter der Kontrolle des Blumenkohl-Mosaikvirus-35S-Promotors nur zu geringen phänotypischen Änderungen. Obwohl hohe konstitutive Expression auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, war die Proteinmenge durch den Fe-Ernährungszustand reguliert (M.L. Guerinot, pers. Mitt.). Dies wurde durch posttranslationale Regulation erklärt. Ähnliche posttranslationale Modifikationen wurden für ZRT1 und für Metalltransporter der *Nramp*-Familie in Hefe gefunden (GITAN *et al.* 1998, LIU UND CULOTTA 1999). Ein Ziel für die Zukunft ist daher, die translationale Regulation der *LeIRT*-Proteine sowie posttranslationale Ereignisse zu untersuchen und eventuelle Fe-regulierte Proteinasen zu identifizieren.

Analyse der *LeIRT*-Gene

In Southern-Blot-Experimenten wurde die Organisation der *LeIRT*-Gene untersucht. Dabei wurde genomische Tomaten-DNA mit Restriktionsenzymen gespalten, die „klebrige“ Enden (*sticky ends*) hinterlassen und die innerhalb der cDNA nicht schneiden. Nur mit den Enzymen *BglII*, *HindIII* und *EcoRI* konnten deutlich hybridisierende Banden unter 11 kb erhalten werden. Alle anderen Enzyme spalteten die genomische DNA offenbar in Fragmente, die zu groß waren, um in dem verwendeten System sauber getrennt zu werden, da sie nur verschmierte Signale lieferten. Der hohe AT-Gehalt genomischer Tomaten-DNA macht das Schneiden von Enzymen mit GC-reicher Erkennungssequenz unwahrscheinlich. Dies könnte die fehlenden oder verschmierten Hybridisierungssignale mit *PstI*, *NotI*, *KpnI*, *AatII*, *Sall* und *SacI*, aber nicht mit *XbaI* erklären. Die erstgenannten Restriktionsenzyme haben vier oder mehr GC-Paare in ihrer Erkennungssequenz und schneiden daher mit geringerer Wahrscheinlichkeit im Tomaten-Genom. Die Hybridisierungsmuster mit *LeIRT1* oder mit *LeIRT2* waren in beiden Fällen gleich. Lediglich die Hybridisierungssignale, die durch Spaltung mit *HindIII* erhalten wurden, zeigten einen geringen, quantitativen Unterschied (nicht gezeigt).

Das durch Spaltung mit *Bgl*III erhaltene, hybridisierende 9 kb große DNA-Fragment erwies sich als Doppelbande. Es ließ sich mit *Xba*I zu einem Fragment von etwa 3 kb und mit *Sal*I zu einem Fragment von etwa 2,3 kb verkleinern (Abb. 23). Außerdem blieben nicht unerhebliche Teile der 9 kb-Bande erhalten, obwohl ein Überschuß an Enzym eingesetzt wurde und unvollständiger Verdau daher nicht zu erwarten war. Dies zeigt deutlich, daß die 9 kb große Bande tatsächlich aus zwei DNA-Fragmenten besteht. Vermutlich handelt es sich dabei um *LeIRT1* und *LeIRT2*, die beide mit der *LeIRT2*-Sonde hybridisierten. Weiterhin fand sich in der mit *Bgl*III gespaltenen Tomaten-DNA eine schwach hybridisierende Bande bei etwa 5 kb. Diese Bande wurde durch zusätzlichen Verdau mit *Apa*I zu einem 1 kb großen Fragment verkleinert, wobei die 9 kb-Bande nicht betroffen war. In dem sequenzierten genomischen Fragment wurde keine *Apa*I-Schnittstelle gefunden. Dies läßt vermuten, daß die 5 kb große Bande von einem ähnlichen, kreuzhybridisierenden Gen herrührt, das bisher nicht identifiziert worden ist. In *Arabidopsis thaliana* wurden bislang über 16 Vertreter der ZIP-Genfamilie gefunden. Ihre Nucleotidsequenzen sind ähnlich genug, um selbst unter stringenten Waschbedingungen mit Sequenzen der anderen Familienmitglieder zu hybridisieren. Es ist durchaus zu erwarten, daß auch in Tomate weitere ZIP-Gene vorhanden sind.

Aus den Southern-Blot- und den genomischen Sequenzdaten läßt sich eine grobe Kartierung der *LeIRT*-Gene vornehmen (Abb. 39). Dabei konnte eine Bande des *Hind*III-Verdaus nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Sequenz der *LeIRT*-Gene weist eine *Hind*III-Schnittstelle an Position 4662 aus. Man würde daher zwei mit *LeIRT2* hybridisierende Fragmente erwarten, wenn *LeIRT1* kreuzhybridisiert. Tatsächlich wurden drei hybridisierende Banden gefunden. Dies deutet auf mindestens ein weiteres *LeIRT*-ähnliches Gen im Tomatengenom hin.

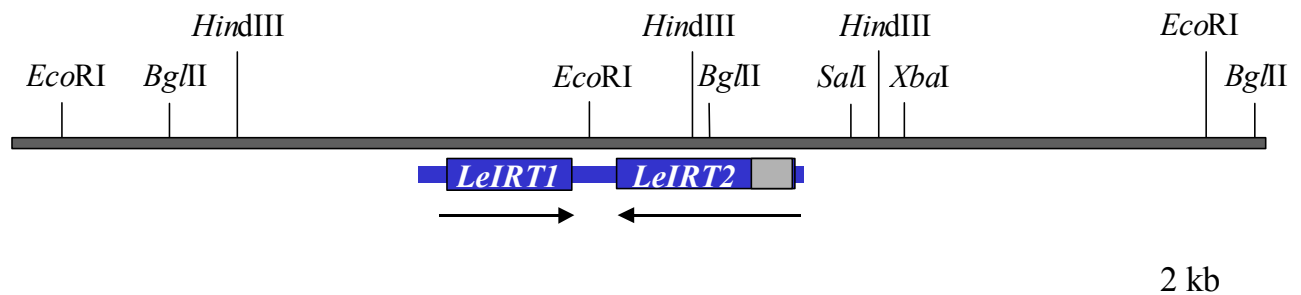


Abb. 39: Karte der *LeIRT*-Gene. Die sequenzierten Bereiche sind blau markiert. Die ungefähren Positionen der Restriktionsschnittstellen sind Ergebnis der Southern-Blot-Analysen. Der grau gezeichnete Bereich des *LeIRT2*-Gens symbolisiert die Hybridisierungssonde der in Abb. 23 gezeigten Autoradiogramme.

Die *LeIRT*-Gene wurden durch PCR-Experimente amplifiziert und sequenziert. Dabei wurden in beiden Genen je zwei Introns identifiziert (Abb. 24, Abb. 26). Dies entspricht der Intronzahl der

in *Arabidopsis* gefundenen *IRT1* und *IRT2*-Gene (Acc.-Nr. AL024486; T16H5.50 und T16H5.40) und der vieler anderer ZIP-Gene.

Bezüglich der Peptidsequenz waren die Positionen der Introns sowohl innerhalb der *LeIRT*-Gene als auch zwischen Tomate und *Arabidopsis* konserviert (Tabelle 10). Das erste Intron lag immer bei einem konservierten Valin-Rest am Beginn der vierten TM-Domäne, das zweite 50 Aminosäuren dahinter bei einem ebenfalls konservierten Alanin-Rest. Jedoch variierte die Länge der Introns in Tomaten zwischen 89 und 986 bp, während sie in *Arabidopsis* um die 100 bp lag.

Tabelle 10: Positionen der Introns in den putativen Fe-Transportergenen aus Tomate und *Arabidopsis*, bezogen auf ihre Aminosäuresequenz

<u>Gen</u>	<u>Intron 1</u>	<u>Intron 2</u>
<i>IRT1</i> :	V189	A238
<i>IRT2</i> :	V200	A250
<i>LeIRT1</i> :	V200	A250
<i>LeIRT2</i> :	V202	A252

Die Exon-Intron-Grenzen der *IRT*-Gene in *Arabidopsis* folgten der Konsensussequenz für pflanzliche Introns (http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/splice_site.html):

Exon --- (TA)G | GT --- Intron --- AG | G(TC) --- Exon.

Die Tomatengene erfüllen im ersten Intron diese Regel, während 5'-Splice-Stellen ihrer zweiten Introns von dieser Regel abweichen (vgl. Abb. 24):

(1. Intron) Exon --- TG | GT --- Intron 1 --- AG | GT --- Exon.

(2. Intron) Exon --- AG | GC --- Intron 2 --- AG | GC --- Exon.

Dies kann damit erklärt werden, daß die meisten Gene, die zur Ermittlung solcher Konsensussequenzen herangezogen werden, aus *Arabidopsis* stammen. Obwohl *Arabidopsis thaliana* in herausragender Weise als Modellpflanze geeignet ist, könnte möglicherweise der Splice-Apparat in Tomaten eine höhere Variabilität der 5'-Splice-Stelle erlauben. Die Guanylyl-Nucleotide der 3'-Splice-Stellen sind jedoch in beiden Pflanzen vollkommen invariabel.

Das Genom von Tomaten umfaßt knapp 1 Gbp und ist damit etwa siebenfach größer als das von *Arabidopsis* (<http://http.tamu.edu:8000/~creel/INTRO.html>). Erstaunlicherweise waren die *LeIRT*-Gene, trotz dieser Größe, direkt zueinander benachbart und zwar in einer Schwanz-zu-Schwanz-Orientierung (Abb. 26). *IRT1* und *IRT2* aus *Arabidopsis* sind ebenfalls direkt zueinander benachbart. Ihre Orientierung ist jedoch Kopf-zu-Schwanz. Die hohe Ähnlichkeit der *LeIRT*- und der *IRT*-Gene, die konservierten Exon-Intron-Grenzen und die nachgewiesene Funktion der

Genprodukte im Metalltransport weisen auf mehrere Genduplikationen in der Evolution der ZIP-Metalltransporter höherer Pflanzen hin. Diese Genduplikationen haben aber im Vergleich zur Trennung der Arten wahrscheinlich erst spät stattgefunden. Darauf weisen die unterschiedlichen Orientierungen der benachbarten Gene in Tomaten und *Arabidopsis* hin. Die komplette Sequenzierung des Genoms von *Arabidopsis thaliana* wird in wenigen Wochen abgeschlossen sein. Mit dieser Information werden möglicherweise weitere *IRT1*-ähnliche Gene identifiziert werden. Die evolutionären Wurzeln der Metalltransporter können dann detailliert untersucht werden.

Durch inverse PCR-Experimente wurden 5'-Sequenzen der beiden Gene amplifiziert und isoliert. Der Transkriptionsstartpunkt von *LeIRT1* ist an einer Adeninbase, 79 Nucleotide *upstream* zum Translations-Startcodon lokalisiert. Eine Sequenz, die gut mit der Konsensussequenz eukaryotischer TATA-Boxen übereinstimmt, wurde 22 - 30 bp *upstream* des Transkriptionsstarts gefunden und eine putative CAAT-Box an Position -120 bis -125 war ebenso vorhanden. In *LeIRT2* gibt es drei putative Transkriptionsstartpunkte: der am weitesten entfernte ist C an Position -65 relativ zum Startcodon. Eine AT-reiche Region wurde 17 bis 25 bp *upstream* zu diesem Nukleotid gefunden. Sie stimmt nur schwach mit der TATA-Konsensussequenz überein. Schließlich konnte keine gute Übereinstimmung mit CAAT-Sequenzen in *LeIRT2* gefunden werden. Diese Daten und die schwächere Expression von *LeIRT2* unter Fe-Mangel, geben Grund zu der Annahme, daß *LeIRT1* eine größere Funktion als *LeIRT2* im Fe- und Metalltransport hat.

Die Analyse der genomischen Sequenz der *LeIRT*-Gene wird es ermöglichen, regulatorische Mechanismen der Geninduktion unter Fe-Mangel aufzuklären. Experimente sind im Gange, um die Promotoren von *LeIRT1* und *LeIRT2* zu identifizieren. Ein Plasmid, das es ermöglicht, Promotor-GUS-Fusionen für transiente Expressionen zu konstruieren, wurde in dieser Arbeit erstellt. Vorversuche zur Isolation von Tomatenwurzel-Protoplasten, die anschließend transient transformiert werden sollten, waren ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt). Hier bietet sich die Möglichkeit der transienten Genexpression in Blattscheiben von Tabak an (KAPILA *et al.* 1997). Sie wurde erfolgreich mit *Arabidopsis*-Promotoren durchgeführt und sollte mit Promotoren aus Tomaten, die Tabak verwandter sind als *Arabidopsis*, ebenfalls funktionieren.

Southern-Blot-Analysen der *LeIRT*-Gene deuten auf eine große Genfamilie hin. Die Funktion der Genprodukte im Fe-Transport wurde gezeigt. Dieser erwies sich jedoch als recht unspezifisch gegenüber den transportierten Metallionen. In *Arabidopsis thaliana* wurden vier Zinktransporter (ZIP1-ZIP4) identifiziert (GROTZ *et al.* 1998). Ein weiterer ist in der Datenbank zu finden (ZIP5). Es wurde gezeigt, daß die Zinktransporter sich nicht durch Fe in ihrer Funktion inhibieren ließen (GROTZ *et al.* 1998), während der Fe-Transporter IRT1, ebenso wie die in dieser Arbeit beschriebenen Transporter, stark durch Zn inhibiert wurde (EIDE *et al.* 1996). Schließlich wurde Zn-Transport durch IRT1 nachgewiesen (KORSHUNOVA *et al.* 1999). Es stellt sich daher die Frage, ob man die Fe-Transporter von den Zn-Transportern anhand ihrer Polypeptidsequenzen unterscheiden kann. Eine hierzu angestellte phylogenetische Analyse stellt die *LeIRT*-Proteine in eine Gruppe mit IRT1 aus *Arabidopsis* (Abb. 40). Diese Gruppe umfaßt neben Polypeptiden unbekannter Funktion vorwiegend Fe-Transporter. Sie ist klar von den Zn-Transportern

abgetrennt. Weitere phylogenetische Gruppen stellen die ZIP-Proteine aus Hefe sowie putative plastidäre Metalltransporter dar (Abb. 40). Aufgrund dieser Analyse kann vermutet werden, daß die physiologische Funktion der LeIRT-Proteine im Fe- und weniger im Zn-Transport besteht. Die Klassifizierung der Metalltransporter anhand ihrer phylogenetischen Verwandtschaft in Zn- und Fe-Transporter kann jedoch nur ein Anhaltspunkt für weitere experimentelle Charakterisierungen sein. In dieser Hinsicht muß besonders die transkriptionelle Regulation im Bezug auf die Zn-, die Cu-, und die Mn-Ernährung untersucht werden.

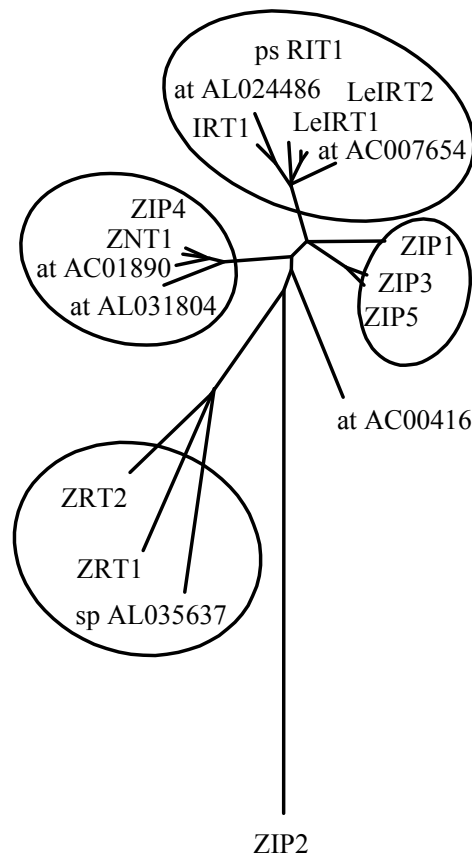


Abb. 40: Phylogenetische Analyse einiger Mitglieder der ZIP-Genfamilie. ZIP-Proteine aus Säugern, Insekten, Hefen, Nematoden und Pflanzen wurden in der Datenbank gefunden. Sie wurden mit Hilfe des ClustalW-Programmes angeordnet, größere Lücken wurden aus dem Alignment entfernt und die phylogenetische Analyse wurde mit Hilfe der Phylip Programmgruppe durchgeführt. Nur die Sequenzen aus Pflanzen und Hefen sind berücksichtigt. Bei unbekannter Funktion der Proteine ist die Abkürzung der Spezies und die Accession-Nummer angegeben (at = *Arabidopsis thaliana*; ps = *Pisum sativum*; sp = *Schizosaccharomyces pombe*).

In der Fe-Ernährung von Hefe wurde ein hoch- und ein niedrigaffines Aufnahmesystem beschrieben, die sich in ihrem Transportmechanismus grundlegend unterscheiden (EIDE 1998). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in höheren Pflanzen ebenfalls ein Fe-Transportsystem existiert, das noch nicht identifiziert ist. Die Kenntnisse zur Fe-Assimilation in Pflanzen gründen

sich ausnahmslos auf die funktionelle Expression in Hefe. Ein komplexes Mehrkomponentensystem aus Pflanzen kann jedoch nicht durch Hefekomplementation identifiziert werden. Auch ist die Rolle der *Nramp*-Proteine im Metalltransport höherer Pflanzen nicht geklärt. In Zebrafischen und Säugern wurde kürzlich der Fe-Transporter „Ferroportin“ beschrieben, der wahrscheinlich den Export von Fe aus den Darmepithelzellen vermittelt (DONOVAN *et al.* 2000). Mehrere ferroportinähnliche Sequenzen wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* gefunden. Ihre Bedeutung ist bisher völlig unklar. Weiterhin wurde in Säugern das Fet3p-homologe Protein „Hephaestin“ beschrieben. Es ist wie Ceruloplasmin und Fet3p eine kupferhaltige Ferroxidase und katalysiert die Oxidation von Fe^{2+} durch Sauerstoff (VULPE *et al.* 1999). Ein Mechanismus ähnlich der Fe-Assimilation in Hefe ist daher in Säugern möglich und kann auch für höhere Pflanzen nicht ausgeschlossen werden, obwohl Einzelheiten des Fe-Imports und -Exports in Einzellern und mehrzelligen Organismen unterschiedlich geregelt erscheinen (NELSON 1999).

Um der Frage nachzugehen, welche Aufgabe die *LeIRT*-Proteine in der Pflanzenernährung haben, ist es sinnvoll, ihre Expression mit Hilfe der *Antisense*-Technik gezielt zu verringern. Entsprechende Konstrukte wurden mit den *LeIRT*-cDNAs erstellt und in *Agrobacterium* eingebracht. Transgene Tomaten konnten jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht regeneriert werden (Daten nicht gezeigt).

Ausblick

Fe-Defizienz ist ein gravierendes Problem in der Landwirtschaft, da nicht die Menge an Fe, sondern vor allem seine Verfügbarkeit für das Pflanzenwachstum limitierend ist (VOSE 1982, MARSCHNER 1986). In Sojabohnen wurde gezeigt, daß Linien mit hoher Fe^{3+} -Chelatreduktase besonders Fe-effizient sind (RÖMHELD 1987). Die Isolierung des *FRO2*-Gens (ROBINSON *et al.* 1999) und der *IRT1*-cDNA aus *Arabidopsis thaliana* (EIDE *et al.* 1996) ebneten den Weg für die Isolation homologer Gene aus Ertragspflanzen. Obwohl die *FRO2*-cDNA den Fe^{3+} -Reduktase-defizienten Phänotyp von *fre1*-Hefemutanten nicht komplementieren konnte (eigene unveröffentlichte Daten), wurde von einem *FRO2*-Homolog aus Erbsen berichtet, das hierzu in der Lage war (Waters, Blevins und Eide: Poster, 10th International Symposium on Iron Nutrition and Interactions in Plants. Houston TX, 14. - 19 Mai 2000).

Die unmittelbare Aussicht, Fe-regulierte Promotoren aus Tomaten zu identifizieren, eröffnet die Möglichkeit, transgene Pflanzen mit gesteigerter oder verminderter Fe-Assimilation zu generieren. In der nahen Vergangenheit wurden Phytoferritin-Gene aus Sojabohnen in Reis und Tabak überexprimiert. Dabei wurde gezeigt, daß diese Pflanzen zum einen mehr Fe in ihren Blättern speichern (GOTO *et al.* 1999) und zum anderen toleranter gegenüber oxidativem Stress sind (VAN WUYTSWINKEL *et al.* 1999). Es wurde vermutet, daß durch die Überexpression des Speicherproteins Phytoferritin große Mengen Fe aus dem Cytosol abgezogen werden und für die Katalyse der Fenton-Reaktionen und der damit verbundenen Toxizität nicht mehr zur Verfügung stehen. Diese Pflanzen sind offensichtlich an reaktivem, cytosolischem Eisen verarmt. Es ist zu erwarten, daß diese Pflanzen in Kalkböden oder an Fe-Mangelstandorten große

Wachstumsprobleme haben. Die Überexpression der Fe-Transporter sollte den entgegengesetzten Effekt haben: es könnten Pflanzen generiert werden, die gerade auf Fe-limitierten Standorten besser wachsen können. Die Verwendung Fe-regulierter Promotoren könnte hier eine Feinregulation bewirken, die dazu führt, die Fe-Versorgung entsprechend des Fe-Bedarfes zu steigern, ohne daß größere toxische Wirkungen zu erwarten sind. Denkbar wäre auch die Expression von Siderophor-Transportsystemen in Pflanzen, die es ermöglichen, bakterielle oder Pilz-Siderophore zu nutzen. Dazu könnte das kürzlich identifizierte *SITI*-Gen aus Hefe (LESUISSE *et al.* 1998) verwendet werden.

Die mögliche Identifizierung der *LeIRT*-Promotoren kann zur Isolierung eisenmangelspezifischer Transkriptionsfaktoren herangezogen werden. Die in dieser Arbeit konstruierte cDNA-Bank ist induzierbar und könnte für einen entsprechenden „*South-Western-Screen*“ benutzt werden. In Hefe wurde die sogenannte „*iron box*“ identifiziert, eine Sequenz, die im Promotorbereich fast aller Fe-Assimilationsgene gefunden wurde und die die Fe-Mangel-spezifische Transkription vermittelt (EIDE 1998). Obwohl zu erwarten ist, daß in höheren Pflanzen noch weitere Faktoren wie Phytohormone oder ein phloemmobiles Signalmolekül (GRUSAK 1995, GRUSAK UND PEZESHGI 1996) eine Rolle in der transkriptionellen Fe-Mangelantwort spielen, ist eine ähnliche Regulation im Falle der *LeIRT*-Gene denkbar.

4.2 Physiologie der Fe-Assimilation in *Chlamydomonas*

Die zu Anfang dieser Arbeit bekannten molekularen Ansätze zur Charakterisierung der Fe-Assimilation höherer Pflanzen, insbesondere die Mißerfolge differentieller *Screening*-Methoden sowie der Komplementation von *fre*-Hefemutanten, machten es notwendig, das Forschungsgebiet um einen neuen Organismus zu erweitern. Dabei bot sich die einzellige, eukaryotische Alge *Chlamydomonas reinhardtii* an, weil sie einfach zu kultivieren, molekularbiologisch und genetisch ausgezeichnet zugänglich und bereits weit charakterisiert ist. Obwohl in *Chlamydomonas* keine autonom replizierenden Plasmide bekannt sind, läßt sich diese Alge transformieren, wobei die eingebrachte DNA an willkürlichen Stellen ins Kern- oder Chloroplastengenom der Alge integriert. Dies ist eine einfache und effektive Art der Mutagenese (TAM UND LEFEBVRE 1993). Insbesondere zellbiologische und photosynthetische Fragestellungen wurden in *Chlamydomonas* bearbeitet (ROCHAIX 1995). Seit zwei Jahren gibt es ein Genomprojekt für *Chlamydomonas reinhardtii*. Im Gegensatz zu den meisten höheren Pflanzen hat *Chlamydomonas* ein sehr GC-reiches Kerngenom (>65%). Dies hängt mit einem strengen Codongebrauch zusammen, der fast immer an der dritten Position ein G oder C positioniert (<http://biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/codon.html>). Es ist daher zum einen nahezu unmöglich, *Chlamydomonas*-Gene durch heterologes *Screening* mit Sequenzen höherer Pflanzen zu isolieren und *Chlamydomonas*-Gene heterolog zu exprimieren. Zum anderen bietet der strenge Codongebrauch die Gelegenheit reverser Genetik. Die aus der Isolation und Sequenzierung von Proteinen resultierenden Peptidsequenzen lassen nur wenige Möglichkeiten für das Design von Oligonucleotiden offen, so daß PCR-Reaktionen sehr schnell zum Erfolg führen können (ROCHAIX 1995).

Die Fe-Assimilation ist für Algen generell ein größeres Problem als für ortsgebundene Landpflanzen. In einer wässrigen Umgebung kann das Eisen, egal ob es als chelatisiertes oder freies Ion vorliegt, frei diffundieren, während im Boden die Diffusion vergleichsweise eingeschränkt ist. Daher muß die zur Fe-Assimilation verwandte Anstrengung größer sein als bei den Landpflanzen. Tatsächlich ist Fe in einigen Bereichen der Ozeane der limitierende Faktor für das Wachstum von Phytoplankton und damit für die gesamte marine Biomasseproduktion (MARTIN UND FITZWATER 1988; BEHRENFELD UND KOLBER 1999).

Verschiedene Mechanismen der Fe-Assimilation wurden in Algen gefunden: In *Scenedesmus incrassulata* wurde die Sekretion von Siderophoren nachgewiesen (BENDERLIEV UND IVANOVA 1994), eine Reaktion, die der von Mikroorganismen und Gräsern ähnelt (Strategie II, BIENFAIT 1988). In der halophilen Alge *Dunaliella salina* wurde ein Transferrin-ähnliches Protein gefunden, das den Fe-Transport vermittelt und dessen Expression durch die Salzkonzentration der Umgebung reguliert wird (FISHER *et al.* 1998). Ein Transferrin-abhängiger Mechanismus ist aus Säugern bekannt. Bei ihnen erfolgt die Beladung von Transferrin im Blutserum oxidativ durch die Wirkung von Ceruloplasmin. Dieses kupferhaltige Serumprotein katalysiert die Oxidation von Fe^{2+} durch Sauerstoff. Das dabei entstehende Fe^{3+} wird an Transferrin gebunden und zusammen mit ihm über den Transferrinrezeptor durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Neuere Arbeiten berichten von Ceruloplasmin-abhängiger, aber Transferrin-unabhängiger Fe^{3+} -Aufnahme in menschliche Zellen (ATTIEH *et al.* 1999). Ähnliche Vorgänge wurden in Hefe beschrieben: Hier wird das durch die Fe^{3+} -Reduktasen entstandene Fe^{2+} durch das Fet3-Protein re-oxidiert, bevor es durch das Ftr1-Protein als Fe^{3+} ins Innere der Zellen transportiert wird (EIDE 1998). In *Chlorella vulgaris* wurde die Assimilation angebotener Fe^{3+} -Siderophoren als reduktiv beschrieben (ALNUTT UND BONNER 1987A, ALNUTT UND BONNER 1987B). Eisenchelate-Reduktase wurde auch in *Chlorella pyrenoidosa* nachgewiesen, obwohl keine Substratsättigung gefunden wurde (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). Zusammengefasst scheinen Algen über die gesamte Bandbreite der bekannten Fe-Assimilationsreaktionen zu verfügen.

Fe^{3+} -Chelatreduktase in *C. reinhardtii*

In dieser Studie wurde *Chlamydomonas reinhardtii* als neuer Modellorganismus zur Untersuchung der Fe-Assimilation etabliert. Es wurde gezeigt, daß *Chlamydomonas*-Zellen unter Fe-Mangel eine Fe^{3+} -Chelatreduktase über 15-fach induzieren. Diese Induktion ist höher als die in höheren Pflanzen gemessene (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). Außerdem stellen *Chlamydomonas*-Zellen eine annähernd homogene Population dar, während in den Wurzeln höherer Pflanzen nur wenige Zellen tatsächlich die Fe^{3+} -Chelatreduktase exprimieren (Abb. 4). Parallel zur Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktase wird Fe-Transportaktivität induziert. Diese beiden Enzymaktivitäten deuten darauf hin, daß *Chlamydomonas*, ebenso wie die meisten höheren Pflanzen, in einer „Strategie I“-Reaktion Fe^{3+} -Chelate zunächst reduzieren muß, um anschließend Fe^{2+} transportieren zu können (CHANEY *et al.* 1972, RÖMHELD 1987, BIENFAIT 1988).

Die Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas reinhardtii* wurde in dieser (ECKHARDT UND

BUCKHOUT 1998) und in einer zeitgleich erschienen Studie (LYNNES *et al.* 1998) erstmals physiologisch charakterisiert. Langanhaltender, gravierender Fe-Mangel führte zum Ausbleichen der Zellen. Dieses Phänomen wurde von LYNNES *et al.* 1998 quantifiziert.

Die Aktivität der Fe^{3+} -Chelatreduktase war abhängig von der Fe-Konzentration des Wachstumsmediums. Unterhalb von etwa 4 μM Fe im Medium war diese Aktivität nach zwei Tagen stark induziert. Daraus läßt sich der Fe-Bedarf der Algen abschätzen, der offensichtlich bei Konzentrationen um die vier μM gedeckt ist. Dies liegt im Bereich der für höhere Pflanzen empirisch bestimmten Nährlösungskonzentrationen (EPSTEIN 1972).

Die Kinetik der Induktion wurde untersucht: Nach etwa 4 - 6 Stunden Fe-defizientem Wachstums wurde eine deutliche Steigerung der Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität meßbar, nach etwa 20 - 24 Stunden war sie maximal induziert und sank beim Erreichen der spät-exponentiellen Wachstumsphase wieder ab. Die Induktionskinetik der Fe^{3+} -Chelatreduktase deutet auf die Neusynthese des Enzyms unter Fe-Mangel hin. Dafür sprechen auch Inhibitionsversuche der Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktase durch Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, obwohl Kontrollexperimente fehlten (A. Herbig, pers. Mitt.).

Hefezellen sind in der Lage, Fe- und Cu-Mangel direkt durch die spezifischen Transkriptionsaktivatoren, Aft1p und Mac1p, zu messen. Diese Proteine binden Fe- oder Cu-Ionen und sind in diesem Zustand inaktiv. Unter Mangelbedingungen oder in sogenannten „up“-Mutanten, sind die entsprechenden Bindungsstellen unbesetzt und die Proteine aktivieren die Transkription der Fe- und Cu-Assimilationsgene (EIDE 1998). In Hefe konnte keine Signaltransduktion der Fe-Mangelantwort durch Proteinphosphorylierung oder ähnliche Mechanismen beobachtet werden. In *Chlamydomonas* durchgeführte Inhibitionsversuche der Fe^{3+} -Chelatreduktase mit Protein-kinase- und -phosphataseinhibitoren konnten keinen Aufschluß über die Signaltransduktion des Fe-Mangels geben (Daten nicht gezeigt). Daher schlage ich eine ähnliche Regulation wie in Hefe auch für *Chlamydomonas* vor. Signaltransduktionen über längere Strecken, wie sie für höhere Pflanzen postuliert wurden (GRUSAK UND PEZESHGI 1996), können für einzellige Organismen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. In höheren Pflanzen sind die Orte des größten Fe-Bedarfes (Blätter, Blüten, Samenanlagen) von denen der Fe-Assimilation (Wurzeln) räumlich getrennt. Die Beteiligung von Phytohormonen wie Auxin und Ethylen an der Fe-Mangelantwort, sowie eines Signalmolekül, das im Phloem transportiert wird (GRUSAK 1995, GRUSAK UND PEZESHGI 1996), wurden postuliert aber bisher nicht auf molekularer Ebene nachgewiesen. In Bezug auf die Wahrnehmung und die Reizübertragung des Fe-Mangels ist es wahrscheinlich, daß *Chlamydomonas* als einzellige Alge sich von höheren Pflanzen unterscheidet und eine Regulation ähnlich wie in Hefe zeigt.

Die Fe^{3+} -Chelatreduktase ist energieabhängig, da sie durch FCCP und Valinomycin signifikant gehemmt wurde und ein Chloroplasten-ATPase-defizienter Stamm unter Fe-defizienten Bedingungen keine Induktion der Reduktaseaktivität zeigte (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998). Ihr pH-Optimum lag im neutralen Bereich zwischen pH 6,5 und 7,0. LYNNES *et al.* 1998 konnten, im Gegensatz zu den hier dargestellten Untersuchungen, keine pH-Abhängigkeit der Fe^{3+} -Chelatreduktase und der Ferricyanidreduktase in *Chlamydomonas* feststellen. Dies muß an den

von LYNNEs *et al.* 1998 verwendeten Untersuchungsmethoden liegen, die von mir nicht reproduziert werden konnten. Insbesondere war es in unserem Labor, trotz eines hochwertigen *Diode Array*-Spektrophotometers (BECKMAN) nicht möglich, die Absorption des Fe^{2+} -BPDS Komplexes ohne vorheriges Abtrennen der Zellen zu messen, was LYNNEs *et al.* 1998 konnten. In meinen Untersuchungen lag die durch die Zellen verursachte Lichtstreuung mehr als zehnfach über der Absorption des Fe^{2+} -BPDS-Komplexes, so daß das Rausch/Signal-Verhältnis für sinnvolle Messungen viel zu groß war (nicht gezeigt).

Die Fe^{3+} -Chelatreduktase war sättigbar mit einem apparenten K_m -Wert von etwa 30 μM , was, angesichts der geringen Fe-Konzentrationen, mit denen die Algen in ihrer natürlichen Umgebung konfrontiert sind, erstaunlich hoch ist. Bei der Bewertung dieser K_m -Werte muß bedacht werden, daß die Messungen an ganzen Zellen durchgeführt wurden, und daß möglicherweise in *Chlamydomonas* mehrere Plasmamembran-Redoxsysteme existieren. In den Wurzeln höherer Pflanzen wurden apparente K_m -Werte für Fe^{3+} -EDTA zwischen 28 und 230 μM und in isolierten Plasmamembranen zwischen 21 und 230 μM gemessen (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). Die in *Chlamydomonas* gemessenen K_m -Werte bewegen sich demnach in Konzentrationsbereichen ähnlich derer höherer Pflanzen. Die hohen Werte könnten auf die synthetischen Chelatoren zurückzuführen sein, die zwar die Messung erleichtern, aber nicht das natürliche Substrat der Fe^{3+} -Chelatreduktasen darstellen und möglicherweise mit geringerer Affinität reduziert werden.

In höheren Pflanzen wurde die Existenz zweier Plasmamembran-Redoxsysteme beschrieben: das konstitutive „Standard-System“ und das Fe-Mangel-induzierte „Turbo-System“ (als Überblick: LÜTHJE *et al.* 1997). Das Standard-System wurde meistens unter Verwendung von Elektronenakzeptoren mit extrem niedrigen Reduktionspotentialen, wie Hexacyanoferrat(III) oder Hexabromoiridat(IV) gemessen. Es ist offensichtlich, daß die Redox-Systeme, die Fe^{3+} -Chelate reduzierten, entsprechend der Reduktionspotentiale der Substrate, auch Hexacyanoferrat(III) reduzieren konnten (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994, LYNNEs *et al.* 1998, sowie eigene, unveröff. Daten). Der umgekehrte Fall wurde von LYNNEs *et al.* 1998 postuliert, aber nicht nachgewiesen. Fe-gehungerte *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen reduzierten zunächst das gesamte Hexacyanoferrat(III), bevor gleichzeitig angebotene Fe^{3+} -Chelate reduziert wurden (LYNNEs *et al.* 1998). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß Hexacyanoferrat(III) ein geeignetes Substrat für die Messung der eisenmangelinduzierten Fe^{3+} -Chelatreduktase sei. Dieser Schluß ist meines Erachtens nach keineswegs zwingend. Die Ergebnisse zeigen vielmehr, daß die Fe^{3+} -Chelatreduktase recht unspezifische Substratpräferenzen hat und daß die am leichtesten reduzierbaren Substrate zuerst reduziert werden.

In Algen, die unter Fe-suffizienten Wachstumsbedingungen herangezogen waren, konnten keine Sättigungskinetiken der Fe^{3+} -Chelatreduktase bis hin zu 300 μM Fe^{3+} -HEDTA gemessen werden. Die geringe und nicht sättigbare Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität Fe-suffizient gewachsener Algen könnte auf die Aktivität des Standard-Systems zurückzuführen sein (LÜTHJE *et al.* 1997). Zusätzlich zu der linearen Komponente war immer auch eine geringe sättigbare Komponente zu bemerken, die möglicherweise basale Level der Eisenmangel-induzierten Turbo-Reduktase repräsentiert. Dies würde die Vermutung bekräftigen, daß die Induktion der Fe^{3+} -Chelatreduktase

auf die Neusynthese des Proteins zurückzuführen ist.

In vitro-Translationsversuche mit isolierter RNA aus *Chlamydomonas*-Zellen, die Fe- und Cu-defizient angezogen wurden, identifizierten drei Fe-, aber nicht Cu-Mangel-induzierte Translationsprodukte mit molekularen Massen zwischen 30 und 40 kDa (HILL *et al.* 1996). Vergleiche der Peptidmuster Fe-gehungelter und Fe-suffizient gewachsener *Chlamydomonas*-Zellen identifizierten ein etwa 150 kDa großes Membranprotein, das Sequenzähnlichkeiten zu der kupferhaltigen Ferroxidase Hephaestin und zu Fet3p aus Hefe aufweist (A. Herbig, pers. Mitt.). Diese Proteine haben ebenfalls Ähnlichkeit zu Ceruloplasmin, welches in Säugern zur oxidativen Beladung von Transferrin, sowie zum Fe^{3+} -Transport in humane Zellen benötigt wird (als Überblick: NELSON 1999).

Höhere Pflanzen, Strategie I

Hefe (*Chlamydomonas* ?)

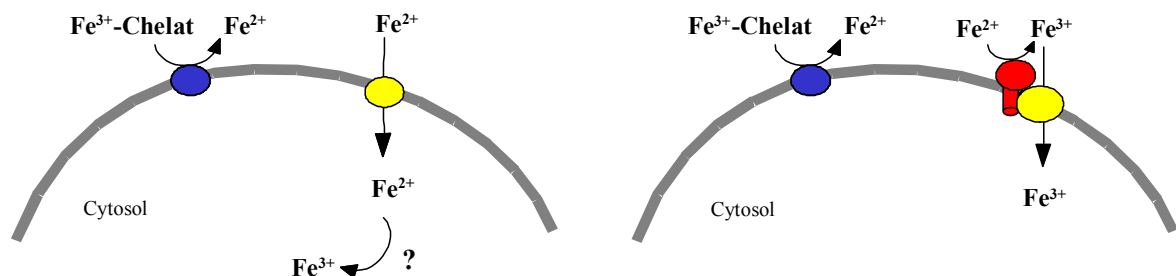


Abb. 41: Vergleich der Fe-Assimilation höherer Pflanzen mit dem hochaffinen Mechanismus in Hefe. Das durch die Fe^{3+} -Chelatreduktasen bereitgestellte Fe^{2+} wird entweder direkt transportiert (höhere Pflanzen, „Strategie I“) oder durch das Fet3-Protein zu Fe^{3+} re-oxidiert und dann transportiert (Hefe).

Diese Daten gaben Anlaß zu der Spekulation, daß der Fe-Transport in *Chlamydomonas reinhardtii* ähnlich zu dem in Hefe erfolgt. Der Einfluß von Cu-Mangel konnte diese Hypothese nicht unterstützen, obwohl hierzu weitere Untersuchungen notwendig sind. Moderater Cu-Mangel über drei bis vier Tage war weder in der Lage, die Fe^{3+} -Chelatreduktase, noch den Fe^{2+} -Transport signifikant zu beeinflussen (Tabelle 8, Abb. 36). Die Reduktase wurde in reproduzierbaren Versuchen gering induziert (10-15%), während der Fe^{2+} -Transport sehr geringfügig durch Cu-Mangel inhibiert wurde. Diese Unterschiede waren zwar reproduzierbar, aber statistisch nicht signifikant (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998). Ähnliche Daten wurden.

Die Induktion einer trans-plasmamembranären Reduktase durch Cu-Defizienz wurde auch im Labor von Sabeeha Merchant (S. Merchant, Los Angeles, CA, pers. Mitt.) gemessen und als Cu^{2+} -Reduktase beschrieben (HILL *et al.* 1996). Es wurde postuliert, daß Cu^{2+} , analog zu Fe^{3+} , zunächst reduziert werden muß, bevor Cu^{+} in die Zelle transportiert werden kann (HASSETT UND KOSMAN 1995). Diese Annahme stützt sich auf die Beobachtung, daß die Fe^{3+} -Chelatreduktasen aus Hefe Fre1p und Fre2p ebenfalls Cu^{2+} -Reduktaseaktivität zeigten (GEORGATSOU UND ALEXANDRAKI 1994) und daß in Erbsenwurzeln eine Cu^{2+} -Reduktase durch Fe-Defizienz und eine Fe^{3+} -

Chelatreduktase durch Cu-Defizienz induziert werden konnte (WELCH *et al.* 1993). Das ebenso einfache wie geniale Experiment, das von CHANEY *et al.* 1972 für die Fe-Aufnahme entwickelt worden ist, nämlich das Abfangen der Fe^{2+} -Ionen durch den Fe^{2+} -spezifischen Chelator BPDS bei angebotenen Fe^{3+} -Chelaten, und die anschließende Messung der Fe-Gehalte in den Sprossen, könnte analog auch mit Cu^{2+} und dem Cu^{2+} -spezifischen Chelator BCDS durchgeführt werden. Solche Versuche sind jedoch nie publiziert worden. Stattdessen stützen sich die Autoren auf indirekte Evidenzen wie die Inhibition der Fe^{3+} -Reduktase in Hefe durch Platinsalze und einer verbleibenden Restaktivität von unter 5%, die einer vermeintlichen Cu^{2+} -Reduktase zugeschrieben wurde (HASSETT UND KOSMAN 1995). Es ist biologisch sinnvoll, Fe^{3+} -Verbindungen zu reduzieren, da die Löslichkeit von Fe^{2+} erheblich höher ist und außerdem Fe^{3+} -Chelate in der Regel durch die Reduktion gespalten werden. Die Löslichkeit von Cu^{+} ist jedoch wesentlich geringer als die von Cu^{2+} , so daß die Reduktion von Cu^{2+} zur Kupferassimilation wenig Sinn macht. Eine mögliche Erklärung für die Reduktion von Cu^{2+} wäre der Schutz vor Cu-Toxizität durch den Ausschluß von Cu. Dies würde allerdings der Induktion der Fe^{3+} - und der Cu^{2+} -Reduktase unter Cu-Mangel widersprechen. Die plausibelste Erklärung für dieses Dilemma ist die Beteiligung von Cu am Fe-Transport, wodurch die geringe aber reproduzierbare Steigerung der Fe^{3+} -Chelatreduktase erklärt werden könnte. Gleichzeitig muß für die Fe^{3+} -Chelatreduktase eine geringe Substratspezifität angenommen werden, was angesichts der unterschiedlichen Fe^{3+} -Verbindungen im natürlichen Lebensraum von *Chlamydomonas reinhardtii* sinnvoll ist (MOOG UND BRÜGGEMANN 1994). Die Eigenschaften der Cu^{2+} -Reduktase in Tomatenwurzeln wurden von HOLDEN *et al.* 1995 untersucht. Obwohl sie in denselben Reinigungsfractionen wie die Fe^{3+} -Chelatreduktase angereichert wurde, unterschieden sich die beiden Enzymaktivitäten in Bezug auf die Detergens-Latenz, die Substratspezifität und die Elektronendonator-Präferenz.

Fe-Transport in *C. reinhardtii*

Ebenso wie die Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität war der Fe-Transport in *Chlamydomonas* eisenmangelinduziert. Nur in eisengehungerten Zellen wurden signifikante Fe-Aufnahmeraten gemessen. In Kontrollmessungen auf Eis wurde der Anteil unspezifischer Bindung geschätzt. Er lag unter 10 % der bei 30 °C gemessenen enzymatischen Fe-Transportraten.

Ähnlich wie in Tomaten wurden in *Chlamydomonas* erhöhte Fe-Transportraten gemessen, wenn Fe^{2+} und nicht Fe^{3+} als Substrat angeboten wurde. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt als bei den in Hefe exprimierten Tomatenproteinen. Dies ist vermutlich auf die hohe Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität zurückzuführen. Die Fe^{3+} -Chelatreduktase in *Chlamydomonas* war etwa hundert- bis tausendfach höher als die Fe-Transportraten (Tabelle 6). Bei der Fe-Assimilation in *Chlamydomonas* scheint daher der Transport und nicht die Fe^{3+} -Reduktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darzustellen. Diese Aktivität steht im Widerspruch zu den Beobachtungen in Erbsen (GRUSAK *et al.* 1990), verwundert jedoch nicht, wenn die freie Diffusion des reduzierten Eisens bedacht wird. Es erscheint biologisch sinnvoll, erheblich größere Mengen Fe^{3+} zu reduzieren als für die Mineralernährung notwendig sind, da in wässriger Umgebung ein Großteil des Fe^{2+} die Zellen gar nicht erreicht, sondern sofort wegdiffundiert. Um die tatsächlichen Anteile

des Transportes von Fe^{2+} und Fe^{3+} auseinanderzuhalten, ist es notwendig, Fe^{3+} -Chelatreduktase-defiziente oder Fe-Transport-defiziente Mutanten zu verwenden.

Der Fe-Transport in *Chlamydomonas* erwies sich als energieabhängig: in Inhibitionsversuchen konnte der Fe-Transport durch 20 μM FCCP fast vollständig unterbunden werden. Dies legt eine Beteiligung des Membranpotentials am Fe-Transport nahe. Die Transportraten weisen auf eine Akkumulation des Eisens aus der umgebenden Lösung hin. Unter Vernachlässigung der Zellkompartimentierung und bei Annahme eines Zellvolumens von etwa 50 fl (HARRIS 1988) und einer Fe-Transportrate von 20 pmol / h \cdot 10^6 Zellen (Abb. 33) werden nach 30 Minuten 200 μM Fe in den Zellen akkumuliert. Dies ist 100-fach höher als die angebotenen 2 μM des Substrates. Diese Akkumulation liegt im Rahmen des durch das Membranpotential möglichen und muß nicht durch H^+ -Symport energetisiert sein. Evidenzen für einen Protonen-Symport konnten aufgrund der gemessenen Daten nicht gefunden werden.

Der Fe^{2+} -Transport in eisengehungerte *Chlamydomonas reinhardtii*-Zellen konnte durch einen 100-fachen Überschuß an Kupferionen inhibiert werden. Diese Inhibition war abhängig von der Cu-Konzentration (Abb. 35). Dies führte zu der Frage, ob Fe und Cu denselben Transportweg benutzen. Es wurde daher untersucht, ob Cu-Mangel zur Induktion des Fe-Transportes führt. Dies war nicht der Fall (Abb. 36). In Transportversuchen, die zeigen sollten, ob die Inhibition des Fe^{2+} -Transportes durch Cu kompetitiv ist, wurde bei konstanter Cu-Konzentration die Fe^{2+} -Konzentration variiert. Dabei wurde deutlich, daß sich die Inhibition des Fe-Transportes durch Cu auf niedrige Fe-Konzentrationen beschränkt. Bei Fe^{2+} -Konzentrationen oberhalb von etwa 2 μM verlor Cu seinen inhibitorischen Effekt und wirkte sogar stimulierend auf die Fe^{2+} -Aufnahme (Abb. 37). Dieser Effekt kann durch die Existenz mehrerer Fe-Transportsysteme erklärt werden, obwohl allosterische Effekte nicht ausgeschlossen werden können. Der hochaffine Fe^{2+} -Transporter scheint dabei durch Cu inhibierbar zu sein, während der niedrigaffine Transporter durch die Anwesenheit von Cu-Ionen stimuliert wurde.

In nahezu allen untersuchten Organismen existieren hoch- und niedrigaffine Transportsysteme für Übergangsmetall-Ionen (NELSON 1999). Die Regulation dieser Transportsysteme erlaubt eine Feinabstimmung der Aufnahme dieser potentiell toxischen Ionen. In Hefe wurde gezeigt, daß in Mutanten, die im hochaffinen Fe-Transportsystem defizient sind, der niedrigaffine Transportweg verstärkt ausgeprägt ist (DIX *et al.* 1994). Dabei sind transkriptionelle und post-translationale Mechanismen beteiligt (D. Eide, Columbia, MO; pers. Mitt.). Eine ähnliche Regulation schlage ich für den Fe-Transport in *Chlamydomonas* vor. Bei Ausfall oder Inhibition des hochaffinen Aufnahmesystems wird über einen nicht identifizierten Mechanismus der niedrigaffine Transportmechanismus induziert. Um diese Hypothese zu untersuchen, ist die Verwendung von Fe-Transport-Mutanten notwendig. Abb. 42 stellt ein vorläufiges Modell der Fe-Assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* dar, das aus den hier vorgelegten Daten erstellt werden konnte.

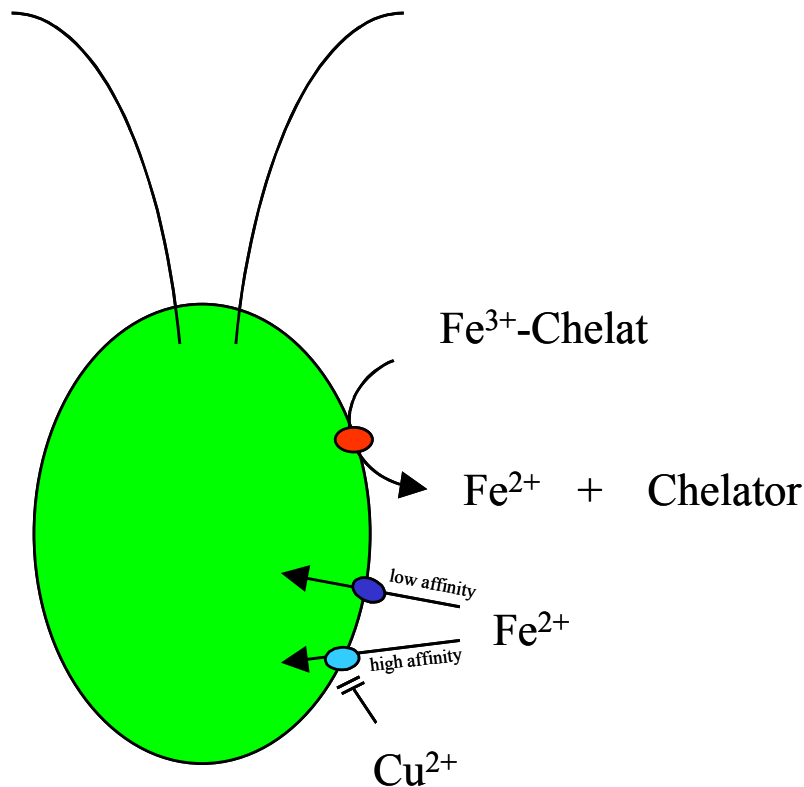


Abb. 42: Modell der Fe-Assimilation in der Alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Unter Fe-Mangel wird eine Fe^{3+} -Chelatreduktase induziert, die das zum Transport benötigte Fe^{2+} bereitstellt. Dieses wird über mindestens zwei unterschiedliche Transportsysteme in die Zellen transportiert. Das hochaffine Transportsystem ist durch Kupferionen inhibierbar.

Ausblick

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stellt *Chlamydomonas reinhardtii* einen ausgezeichneten Modellorganismus für die Analyse der Fe-Assimilationsreaktionen in Pflanzen dar (ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998). Tiefere Einblicke in die Fe-Assimilation dieser Alge werden jedoch erst mit der Verfügbarkeit entsprechender Mutanten gelingen. Insbesondere die quantitative Bewertung der Fe^{3+} -Reduktion im Vergleich zum Fe-Transport wird nur durch Fe^{3+} -Reduktasemutanten gelingen. Zur Selektion von Fe-Transportmutanten wurde in Hefe das Antibiotikum Streptonigrin erfolgreich angewandt (ASKWITH *et al.* 1994).

Die Transformation des Kerngenoms von *Chlamydomonas* stellt eine ausgezeichnete Möglichkeit der Mutagenese dar (TAM UND LEFEBVRE 1993). Die Untersuchung von etwa 20.000 transformierten Kolonien ist notwendig, um einen bestimmten Phänotyp zu identifizieren (P. Lefebvre, St. Louis, pers. Mitt.). Durch Rückkreuzung der Transformanten mit Wildtypzellen umgekehrten Kreuzungstyps kann leicht verifiziert werden, ob die Transformanten nur eine Kopie des Plasmides enthalten. Wenn dies der Fall ist, kann durch „*plasmid rescue*“ das Plasmid und die Integrationsstelle schnell isoliert werden. Mit der bekannten Sequenz der Integrationsstelle kann das entsprechende Gen leicht aus einer Genbank isoliert werden. Eine geordnete BAC-Bank, die

das Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* über dreifach repräsentiert, ist als einzelner Membranfilter kommerziell erhältlich (<http://www.genomesystems.com/cgi-bin/prod-search?K=Chlamydomonas>). Die Hybridisierung dieses Filters mit der Sequenz der Integrationsstelle erlaubt die Identifizierung des genomischen Fragmentes in einem einzigen Experiment. Die hybridisierenden BAC-Klone können dann angefordert werden. Nach Fragmentierung in überschaubare Stücke und Subklonierung kann das Gen durch erneute Hybridisierung gefunden werden.

In Vorversuchen wurde nach einem Testsystem gesucht, um die Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität vieler Kolonien einzeln qualitativ zu messen. Dabei wurden Sprühtests, Überschichtungstests und Filtertest nach dem Beispiel von DANCIS *et al.* 1990 verwendet (nicht gezeigt). Am besten schien der Filtertest geeignet zu sein. Die Algenkolonien wurden mit Hilfe eines Replikastempels geordnet auf Fe-limitierte Agarplatten überführt. Nach etwa einer Woche Wachstum wurden sie auf Nylonmembranen gezogen und die Nylonfilter wurden nacheinander auf Filterpapier mit Testpuffer (20 mM MES, 2 mM K-Acetat, 2 mM Na_3 -Citrat, pH 6,8) und Substratlösung (200 μM Fe-HEDTA und 600 μM BPDS in Testpuffer) im Dunkeln inkubiert. Die entstandene Rotfärbung wurde deutlich, nachdem die Zellen unter Leitungswasser vorsichtig abgespült worden waren. Diese Methode funktionierte nicht bei einer zellwand-defizienten Mutante, da sich die Zellen dieses Stammes nicht abspülen ließen (nicht gezeigt). Obwohl Details dieser Methode noch verbesserungswürdig sind, zeigen diese ersten Vorversuche, daß es möglich ist, durch Filtertest die Fe^{3+} -Chelatreduktaseaktivität vieler Kolonien qualitativ zu analysieren. Die Verfügbarkeit von Mutanten hatte bereits in Hefe zum Durchbruch in der Analyse der Fe-Assimilation geführt (DANCIS *et al.* 1990).

Literatur

- ALNUTT UND BONNER 1987A Alnutt F.C.T. und Bonner Jr. W.D. (1987a): Characterization of iron uptake from Ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **85**, 746-750.
- ALNUTT UND BONNER 1987B Alnutt F.C.T. und Bonner Jr. W.D. (1987b): Evaluation of reductive release as a mechanism for iron uptake from Ferrioxamine B by *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **85**, 751-756.
- ASKWITH *et al.* 1994 Askwith C., Eide D., van Ho A., Bernard P.S., Li L., Davis-Kaplan S., Sipe D.M. und Kaplan J. (1994): The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell* **76**, 403-410.
- ATTIEH *et al.* 1999 Attieh Z.K., Mukhopadhyay C.K., Seshardi V., Tripoulas N.A. und Fox P.L. (1999) Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. *J. Biol. Chem.* **174**, 1116-1123.
- BAGNARESI *et al.* 1997 Bagnaresi P., Basso B. und Pupillo P. (1997): The NADH-dependent Fe^{3+} -chelate reductases of tomato roots. *Planta* **202**, 427-340.
- BAGNARESI *et al.* 1999 Bagnaresi P., Thoiron S., Mansion M., Rossignol M., Pupillo P., Briat J.F. (1999): Cloning and characterization of a maize cytochrome-b5 reductase with Fe^{3+} -chelate reduction capability. *Biochem. J.* **338** 499-505.
- BEHRENFELD UND KOLBER 1999 Behrenfeld M.J. und Kolber Z.S. (1999) Widespread iron limitation of phytoplankton in the south pacific ocean. *Science* **283**, 840-843.
- BENDERLIEV UND IVANOVA 1994 Benderliev KM. und Ivanova NI. (1994): High-affinity siderophore-mediated iron-transport system in the green alga *Scenedesmus incrassatulus*. *Planta* **193**, 163-166.
- BERBEN *et al.* 1991 Berben G., Dumont J., Gilliquet V, Bolle P-A. und Hilger F. (1991): The YDp plasmids: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 475-477.
- BIENFAIT 1985 Bienfait H.F. (1985): Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. *J. Bioenerg. Biomembr.* **17**, 73-83.

- BIENFAIT 1988
 Bienfait H.F. (1988): Mechanisms in Fe-efficiency reactions of higher plants. *J. Plant Nutr.* **11**, 605-629.
- BRIAT UND LOBRÉAUX 1997
 Briat J.-F. und Lobréaux S. (1997): Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* **2**, 187-193.
- BUCKHOUT *et al.* 1989
 Buckhout T.J. Bell P.F., Luster D.G. und Chaney R.L. (1989): Iron-stress induced redox activity in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is localized on the plasma membrane. *Plant Physiol.* **90**, 151-156.
- CHANEY *et al.* 1972
 Chaney R.L., Brown J.C. und Tiffin L.O (1972): Obligatory reduction of ferric chelates in iron uptake by soybeans. *Plant Physiol.* **50**, 208-213.
- CLAROS UND V. HEIJNE 1994
 Claros M.G. und v. Heijne G. (1994): TopPredII: an improved software for membrane protein structure predictions. *Comput. Appl. Biol. Sci.* **10**, 685-686.
- COHEN *et al.* 1997
 Cohen C.K., Norvell W.A. und Kochian L.V. (1997): Induction of the root cell plasma membrane ferric reductase. *Plant Physiol.* **114**, 1061-1069.
- COHEN *et al.* 1998
 Cohen C.K., Fox T.C., Garvin D.F. und Kochian L.V. (1998): The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* **116**, 1063-1072.
- DANCIS *et al.* 1990
 Dancis A., Klausner R.D., Hinnebusch A.G. und Barriocanal J.G. (1990): Genetic evidence that ferric reductase is required in iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 2294-2301.
- DANCIS *et al.* 1994A
 Dancis A., Yuan D.S., Haile D., Askwith C., Eide D., Moehle C., Kaplan J. und Klausner R.D. (1994 a): Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: An unexpected role for copper in iron transport. *Cell* **76**, 393-402.
- DANCIS *et al.* 1994B
 Dancis A., Haile D., Yuan D.S. und Klausner R.D. (1994 b): The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). *J. Biol. Chem.* **269**, 25660-25667.
- DANCIS *et al.* 1992
 Dancis A., Roman D.G., Anderson G.J., Hinnebusch A.G. und Klausner R.D. (1992): Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: Molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**, 3869-3873.

- DELHAIZE 1996 Delhaize E. (1996): A metal-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **111**, 849-855.
- DIX *et al.* 1994 Dix D.R., Bridgham J.T., Broderius M.A., Byersdorfer C.A. und Eide D.J. (1994): The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26092-26099.
- DE VOS *et al.* 1986 de Vos C.R., Lubberding H.J. und Bienfait H.F. (1986): Rhizosphere acidification as a response to iron deficiency in bean plants. *Plant Physiol.* **81**, 842-846.
- DOHMEN *et al.* 1991 Dohmen R.J., Strasser A.W.M., Höhner C.B. und Hollenberg C.P. (1991): An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **7**, 691-692.
- DONOVAN *et al.* 2000 Donovan A., Brownli A., Zhou Y., Shepard J., Pratt S.J., Moynihan J., Paw B.H., Drejer A., Barut B., Zapata A., Law T.C., Brugnara C., Lux S.E., Pinkus G.S., Pinkus J.L., Kingsley P.D., Palls J., Fleming M.D., Andrews N.C. und Zon L.I. (2000): Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 776-781.
- ECKHARDT UND BUCKHOUT 1998 Eckhardt U. und Buckhout T.J. (1998): Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants *J. Exp. Bot.* **49**, 1219-1224.
- ECKHARDT *et al.* 2000 Eckhardt U., Mas Marques A. und Buckhout T.J. (2000): Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.* im Druck.
- EIDE *et al.* 1992 Eide D., Davis-Kaplan S., Jordan I., Sipe D. und Kaplan J. (1992): Regulation of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 20774-20781.
- EIDE 1998 Eide D.J. (1998): The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Nutr.* **18**, 441-469.
- EIDE *et al.* 1996 Eide D., Broderius M., Fett J. und Guerinot M.L. (1996): A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5624-5628.

- EITINGER *et al.* 2000 Eitinger T., Degen O., Böhnke U. und Müller M. (2000): Nic1p, a relative of bacterial transition metal permeases in *Schizosaccharomyces pombe*, provides nickel ion for urease biosynthesis. *J. Biol. Chem.* im Druck.
- ENG *et al.* 1998 Eng B.H., Guerinot M.L., Eide D. und Saier Jr. M.H. (1998): Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J. Membrane Biol.* **166**, 1-7.
- EPSTEIN 1972 Epstein E. (1972): *Mineral nutrition of plants: Principles and Perspectives* Wiley, New York.
- FEINBERG UND VOGELSTEIN 1983 Feinberg A.P. und Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- FISHER *et al.* 1998 Fisher M., Zamir A. und Pick U. (1998) Iron uptake by the halotolerant alga *Dunaliella* is mediated by a plasma membrane transferrin. *J. Biol. Chem.* **273**, 17553-17558.
- FROMMER *et al.* 1993 Frommer W.B., Hummel S. und Riesmeier J. (1993): Yeast expression cloning of a cDNA encoding a broad specific amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5944-5948.
- FUKUCHI *et al.* 1999 Fukuchi-Mizutani M., Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T. und Ohta D. (1999) Microsomal electron transfer in higher plants: Cloning and heterologous expression of NADH-Cytochrom b5 Reductase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **119**, 353-361.
- GEORGATSOU UND ALEXANDRAKI 1994 Georgatsou E. und Alexandraki D. (1994): Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 3065-3073.
- GIRITCH *et al.* 1997 Giritch A., Herbik A., Balzer H.-J., Ganai M., Stephan U.-W. und Bäumlein H. (1997): A root-specific iron-regulated gene of tomato encodes a lysyl-tRNA-synthetase-like protein. *Eur. J. Biochem.* **244**, 310-317.
- GITAN *et al.* 1998 Gitan R.S., Luo H., Rodgers J., Broderius M. und Eide D. (1998): Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *J. Biol. Chem.* **273**, 28617-28624.

- GOTO *et al.* 1999 Goto F., Yoshihara T., Shigemoto N., Toki S. und Takaiwa F. (1999): Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nat. Biotechnol.* **17**, 282-286.
- GROOM *et al.* 1997 Groom Q.J., Torres M.A., Fordham-Skelton A.P., Hammond-Kosack K.E., Robinson N.J. und Jones J.D.G (1997): *rbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* **10**, 515-522.
- GROTZ *et al.* 1998 Grotz N., Fox T., Conolly E., Guerinot M.L. und Eide D. (1998): Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7220-7224.
- GRUSAK *et al.* 1990 Grusak M.A. (1990): Does iron deficiency in *Pisum sativum* enhance the activity of the root plasmalemma iron transport protein? *Plant Physiol.* **94**, 1353-1357.
- GRUSAK 1995 Grusak M.A. (1995): Whole-root iron(III)-reductase activity throughout the life cycle of iron-grown *Pisum sativum* L. (Fabaceae): relevance to the iron nutrition of developing seeds. *Planta* **197**, 111-117.
- GRUSAK UND PEZESHGI 1996 Grusak M.A. und Pezeshgi S. (1996): Shoot-to-root signal transmission regulates root Fe(III) reductase activity in the *dgl* mutant of pea. *Plant Physiol.* **110**, 329-334.
- GUERINOT UND YI 1994 Guerinot M.L. und Yi L. (1994): Iron: Nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* **104**, 815-820.
- HALLIWELL UND GUTTERIDGE 1989 Halliwell B. und Gutteridge J.M.C. (1989): Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Ed. Clarendon Press, Oxford, UK.
- HANAHAN 1983 Hanahan D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids: *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- HARRIS 1988 Harris E.H. (1988): The *Chlamydomonas* Sourcebook - A comprehensive guide to biology and laboratory use. Academic Press, San Diego, CA
- HASSETT UND KOSMAN 1995 Hassett R. und Kosman D.J. (1995): Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 128-134.
- HERBIK *et al.* 1996 Herbiik A., Giritch A., Horstmann C., Becker R., Balzer H.-J., Bäumlein H. und Stefan U.-W. (1996): Iron and copper nutrition-dependent changes in protein expression in a tomato wild-type and the nicotianamine-free mutant *chloronerva*. *Plant Physiol.* **111**, 533-540.

- HILL *et al.* 1996 Hill K., Hasset R., Kosman D. und Merchant S. (1996): Regulated copper uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to copper availability. *Plant Physiol.* **112**, 697-704.
- HOLDEN *et al.* 1995 Holden M., Crimmins Jr. T.J. und Chaney R.L. (1995): Cu²⁺ reduction by tomato plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.* **108**, 1093-1098.
- HOLDEN *et al.* 1994 Holden M., Luster D.G. und Chaney R.L. (1994): Enzymatic iron reduction at the root plasma membrane: partial purification of the NADH-Fe chelate reductase. In: *Biochemistry of Metal Micronutrients in the Rhizosphere*. Lewis Publishers, JA Manthey, DE Crowley, DG Luster (eds): Boca Raton, FL, pp 285- 294
- HOLDEN *et al.* 1991 Holden M., Luster D.G., Chaney R.L., Buckhout T.J. und Robinson C. (1991): Fe³⁺-chelate reductase activity of plasma membranes isolated from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) roots. *Plant Physiol.* **97**, 537-544.
- JAKOBS 1994 Jakobs S. (1994): Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern
- JAKOBS *et al.* 1995 Jakobs S., Eckhardt U. und Buckhout T.J. (1995): *Posterabstract. Plant Membrane Workshop*, Regensburg.
- KAPILA *et al.* 1997 Kapila J., de Rycke R., van Montagu M. und Angenon G. (1977): An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science* **122**, 101-108.
- KNEEN *et al.* 1990 Kneen B.E., LaRue T.A., Welch R.M. und Weeden N.F. (1990): Pleiotropic effects of *brz*. *Plant Physiol.* **93**, 717-722.
- KORSHUNOVA *et al.* 1999 Korshunova Y.O., Eide D., Clark W.G., Guerinot M-L. und Pakrasi H.B. (1999): The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.* **40**, 37-44.
- KYTE UND DOOLITTLE 1982 Kyte J. und Doolittle R.F. (1982): A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**, 105-132.
- LANDSBERG 1981A Landsberg E.C. (1981a): Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress in mono- and dicotyledonous plant species. *J. Plant Nutr.* **3**, 579-591.
- LANDSBERG 1981B Landsberg E.C. (1981b): Energy driven H⁺-efflux pump in sunflower roots - activated by Fe deficiency stress. *Plant Physiol.* **67**, S 702

- LANDSBERG 1986
Landsberg E.C. (1986): Function of rhizodermal transfer cells in the Fe stress response of *capsicum annum* L.. *Plant Physiol.* **82**, 511-517.
- LEHRACH *et al.* 1977
Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M. und Boedtke H. (1977): RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**, 4743-4751.
- LESUISSE *et al.* 1995
Lesuisse E., Casteras-Simon M. und Labbe P. (1995): Ferriredutase activity in *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi: colorimetric assays on agar plates. *Anal. Biochem* **226**, 375-377.
- LESUISSE *et al.* 1996
Lesuisse E., Casteras-Simon M. und Labbe P. (1996): Evidence of the *Saccharomyces cerevisiae* ferriredutase system being a multicomponent electron transport chain. *J. Biol Chem.* **271**, 13578-13583.
- LESUISSE *et al.* 1998
Lesuisse E., Casteras-Simon M. und Labbe P. (1998): Siderophore-mediated iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: the *SIT1* gene encodes a ferrioxamine B permease that belongs to the major facilitator superfamily. *Microbiology* **144**, 3455-3462.
- LESUISSE *et al.* 1987
Lesuisse E., Raguzzi F. und Crichton R.R. (1987): Iron uptake by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of a reduction step. *J. Gen Microbiol* **133**, 3229-3236.
- LIU UND CULOTTA 1999
Liu X.F. und Culotta V.C. 1999 . Posttranslational control of *Nramp* metal transport in yeast. Role of metal ions and the *BSD2* gene.: *J. Biol. Chem.* **274**, 4863-4868.
- LOGEMANN *et al.* 1987
Logemann J., Schell J. und Willmitzer L.. (1987): Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem* **163**, 16-20.
- LÜTHJE *et al.* 1997
Lüthje S., Döring O., Heuer S., Lüthen H. und Böttger M. (1997): Oxidoreductases in plant plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 81-102.
- LYNNES *et al.* 1998
Lynnes J.A., Derzaph T.L.M. und Weger H.G. (1998): Iron limitation results in induction ferri cyanide reductase and ferric chelate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **204**, 360-365.
- MARSCHNER 1986
Marschner H. (1986): *Mineral Nutrition of Higher Plants* Academic Press London.

- MARTIN UND FITZWATER 1988 Martin J.H. und Fitzwater S.E. (1988): Iron deficiency limits phytoplankton growth in the north-east Pacific subarctic. *Nature* **331**, 341-343
- MAS MARQUES 1998 Mas Marques A.. (1998): Heterologe Komplementation eines hochaffinen Eisentransporters bei *S. cerevisiae* durch cDNA-Klone aus *Lycopersicon esculentum*. *Diplomarbeit*. Humboldt-Universität zu Berlin (30. 7. 1998)
- MINET *et al.* 1992 Minet M., Dufour M.E. und Lacroute F. (1992): Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* **2**, 417-422.
- MITTLER *et al.* 1998 Mittler R., Feng X. und Cohen M. (1998) Post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco *Plant Cell* **10**, 461-473.
- MITTLER *et al.* 1999 Mittler R, Herr E.H., Orvar B.L., van Camp W., Willekens H., Inze D. und Ellis B.E. (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**, 14165-14170.
- MOOG UND BRÜGGEMANN 1994 Moog P.R. und Brüggemann W. (1994): Iron reductase systems on the plant plasma membrane-A review. *Plant and soil* **165**, 241-260.
- NAKANISHI *et al.* 1993 Nakanishi H., Okumura N., Umehara Y., Nishizawa N.K., Chino M. und Mori S. (1993): Expression of a gene specific for iron deficiency (Ids3) in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Cell Physiol.* **34**, 401-410.
- NELSON 1999 Nelson N. (1999): Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* **18**, 4361-4371.
- NIELSEN *et al.* 1997 Nielsen H., Engelbrecht J., Brunak S. und v. Heijne G. (1997): Identification of procaryotic and eucaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- OKUMURA *et al.* 1991 Okumura N., Nishizawa N.K., Umehara Y., und Mori S. (1991): An iron deficiency-specific cDNA from barley roots having two homologous cystein-rich MT domains. *Plant Mol. Biol* **17**, 531-533.

- OKUMURA *et al.* 1994 Okumura N., Nishizawa N.K., Umehara Y., Ohata T., Nakanishi H., Yamaguchi T., Chino M. und Mori S. (1994): A dioxygenase gene (*Ids2*) expressed under iron deficiency conditions in the roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Mol. Biol* **25**, 705-719.
- PENCE *et al.* 2000 Pence N.S., Larsen P.B., Ebbs S.V., Lethan D.L.D., Lasat M.M., Garvin D.F., Eide D. and Kochian L.V. (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4956-4960.
- RABOTTI UND ZOCCHI 1994 Rabotti G. und Zocchi G. (1994) Plasma membrane-bound H⁺-ATPase and reductase activities in Fe-deficient cucumber roots. *Physiol. Plant.* **90**, 779-785.
- RIESMEIER *et al.* 1992 Riesmeier J.W., Willmitzer L. und Frommer W.B. (1992): Isolation and characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* **11**, 4705-4713.
- ROBINSON *et al.* 1997 Robinson N.J., Sadjuga und Groom Q. (1997): The *froh* gene family from *Arabidopsis thaliana*: Putative iron-chelate reductases. *Plant and Soil* **196**, 245-248.
- ROBINSON *et al.* 1999 Robinson N., Procter C.M., Conolly E.C. und Guerinot M-L. (1999): A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**, 694-697.
- ROCHAIX 1995 Rochaix J.-D. (1995): *Chlamydomonas reinhardtii*: the photosynthetic yeast. *Ann. Rev. Genet.* **29**, 209-230.
- RÖMHELD 1987 Römheld V. (1987): Existence of two different strategies for the acquisition of iron in higher plants. in: Winkelmann G., van der Helm D. and Neilands J.B. (eds): *Iron transport in microbes, plants and animals*. VCH Weinheim, pp. 353-374.
- ROGERS UND BENDICH 1985 Rogers S.O. und Bendich A.J. (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissue. *Plant Mol. Biol.* **5**, 69-76.
- ROSE *et al.* 1990 Rose M.D., Winston F. und Hieter P. (1990): *Methods in Yeast Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
- SAMBROOK *et al.* 1989 Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.

- SAMUELSEN *et al.* 1998 Samuelsen A.I., Martin R.C., Mok D.W.S. und Mok C.M. (1998): Expression of the yeast *FRE* genes in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **118**, 51-58.
- SANGER *et al.* 1977 Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 5463-5467.
- SCHMIDT 1994 Schmidt W. (1994): Effects of various inhibitors on *in vivo* reduction by *Plantago lanceolata* roots. *Plant Soil* **165**, 207-212.
- SCHMIDT UND BUCKHOUT 1997 Schmidt A. und Buckhout T.J. (1997): The response of tomato roots (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to iron deficiency stress: alterations in the pattern of protein synthesis. *J. Exp. Bot.* **48**, 1909-1918.
- SCHOLZ *et al.* 1985 Scholz G., Schlesier G. und Seifert K. (1985): Effect of nicotianamine on iron uptake by the tomato mutant *chloronerva*. *Physiol. Plant.* **63**, 99-104.
- SENTENAC *et al.* 1992 Sentenac H., Bonneaud N., Minet M., Lacroute F., Salmon J.M., Gaymard F. und Grignon C. (1992): Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* **256**, 663-665.
- SHATWELL *et al.* 1996 Shatwell K.P., Dancis A., Cross A.R., Klausner R.D. und Segal A.W. (1996): The *FRE1* ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 14240-14244.
- SIJMONS *et al.* 1984 Sijmons P.C., Lanfermeijer F.C., de Boer A.H., Prins H.B.A. und Bienfait H.F. (1984) Depolarization of cell membrane potential during trans-plasma membrane electron transfer to extracellular electron acceptors in iron-deficient roots of *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiol.* **76**, 943-946.
- STEARMAN *et al.* 1996 Stearman R., Yuan D.S., Yamaguchi-Iwai Y, Klausner R.D. und Dancis A. (1996): A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-1556.
- TAM UND LEFEBVRE 1993 Tam L.W. und Lefebvre P.A. (1993): Cloning of flagellar genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by DNA insertional mutagenesis. *Genetics* **135**, 375-384.

- THOMINE *et al.* 2000
Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.W. und Schroeder J.I. (2000): Cadmium and iron transport of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4991-4996.
- THOMPSON *et al.* 1994
Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994) : CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- TORRES *et al.* 1998
Torres M.A., Onuchi H., Hamada S., Machida C., Hammond-Kosack K.E. und Jones J.D.G. (1998): Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}).. *Plant J.* **14**, 365-370.
- VAN DER ZAAL *et al.* 1999
van der Zaal B.J., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Chardonens A.N., Schat H., Verkleij J.A.C. und Hooykaas P.J.J. (1999): Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiol.* **119**, 1047-1055.
- VAN WUYTSWINKEL *et al.* 1999
van Wuytswinkel O., Vansuyt G., Grignon N., Fourcroy P., und Briat J.F. (1999): Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.* **17**, 93-97.
- VON WIRÉN *et al.* 1994
von Wirén N., Mori S., Marschner H. und Römheld V. (1994): Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv Yellow-Stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiol.* **106**, 71-77.
- VOSE 1982
Vose P.B. (1982): Iron nutrition in plants: a world overview. *J. Plant Nutr.* **5**, 233-249.
- VULPE *et al.* 1999
Vulpe C.D. *et al.* (1999): Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nature Genet.* **21**, 195-199.
- VULPE UND PACKMAN 1995
Vulpe C.D. und Packman S. (1995): Cellular copper transport. *Annu. Rev. Nutr.* **15**, 293-322.
- WALTER *et al.* 1995
Walter A., Pich A., Scholz G., Marschner H. und Römheld V. (1995): Diurnal variations and release of phytosiderophores and nicotianamine in roots and shoots of barley. *J. Plant Physiol.* **147**, 191-196.

- WELCH UND LARUE 1990 Welch R.M. und LaRue T.. (1990): Physiological characteristics of Fe accumulation in the *bronze* mutant of *Pisum sativum* L., cv Sparcle E107 (Brz Brz). *Plant Physiol.* **93**, 723-729.
- WELCH *et al.* 1993 Welch R.M., Norvell W.A., Schaefer S.C., Shaff J.E. und Kochian L.V. (1993): Induction of iron(III) and copper(II) reduction in pea (*Pisum sativum* L.) by Fe and Cu status: Does the root-cell Fe(III)-chelate reductase perform a general role in regulating cation uptake? *Planta* **190**, 555-561.
- WILLIAMS *et al.* 2000 Williams L.E., Pittman J.K. und Hall J.L. (2000): Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1465**, 104-126.
- WOJTASZEK 1997 Wojtaszek P. (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* **322**, 681-692.
- YI UND GUERINOT 1996 Yi Y. und Guerinot M.L. (1996): Genetic evidence that induction of root Fe(III) chelate reductase activity is necessary for iron uptake under iron deficiency. *Plant J.* **10**, 835-844.
- ZHAO UND EIDE 1996A Zhao H. und Eide D. (1996 A): The yeast *ZRT1* gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2454-2458.
- ZHAO UND EIDE 1996B Zhao H. und Eide D. (1996 B): The *ZRT2* gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 23203-23210.
- ZONIA *et al.* 1995 Zonia L.E., Stebbins N.E. und Polacco J.C. (1995): Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.* **107**, 1097-1103.

Danke

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas J. Buckhout für die Überlassung des Themas, das entgegengebrachte Vertrauen, ständige Diskussionsbereitschaft und die Betreuung dieser Arbeit.

Andreas Mas Marques gilt mein Dank für die Konstruktion der Hefemutante AMY43, das *Screening* der Tomaten-cDNA-Bank mit *IRT1*, die Isolation der *LeIRT*-cDNAs und deren teilweiser Charakterisierung im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Dr. Kurt Zoglauer (HU-Berlin) und seiner Arbeitsgruppe für pflanzliche Zell- und Gewebekultur danke ich für die gute Zusammenarbeit, wertvolle Hilfe und die großzügige Möglichkeit, Teile ihrer Laborausstattung mitzubেনutzen.

Der gesamten Arbeitsgruppe für Genetik (Humboldt-Universität) danke ich herzlich für unschätzbare Hilfen in vielen molekularbiologischen Methoden. Ohne Jana Müller und ihrem automatischen Sequencer wären die *LeIRT*-Klone bis heute nicht sequenziert.

Dr. Thomas Eitinger (Mikrobiologie, HU-Berlin) und Dr. Reinhardt Geßner (Virchow-Klinikum, Berlin) möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken, in ihren Isotopenlaboren Aufnahmestudien mit radioaktivem Eisen durchzuführen.

Dr. Christine Lang (TU-Berlin) möchte ich herzlich für ihre Hilfe in hefegenetischen Methoden sowie für die Überlassung der Hefevektoren YDpU, YDpL und YDpW danken.

Prof. Dr. David Eide (Columbia, MO) bin ich für die Hefestämme DEY1453, 64p und ZHY3, sowie für zahlreiche Diskussionen zu Dank verpflichtet. Dr. Yulia Korshunova gilt mein Dank für den Hefestamm SLY3.

Prof. Dr. Mary Lou Guerinot (Hanover, NH) danke ich für die Fairness im wissenschaftlichen Wettbewerb, für hilfreiche Diskussionen und dafür, daß sie uns noch ein paar Themen für unsere Forschung übriggelassen hat.

Dr. Quentin Groom und Prof. Dr. Nigel Robinson (Newcastle-upon-Tyne, England) danke ich besonders herzlich für die Überlassung des *FRO2*-full-length-cDNA-Klons.

Dr. Frank J. Turano (Beltsville, MD) möchte ich herzlich für das entgegengebrachte Vertrauen und die Überlassung des putativen *Arabidopsis thaliana*-Eisenchelatreduktase-Klons danken, der sich später als Cytochrom b5-Reduktase herausstellte.

Christian Bölling danke ich für seine geschickte Assistenz bei den Fe-Aufnahmestudien in Hefe.

Meinen Kollegen Alexandra, Immo, Jeane und Olli und meinen Praktikanten danke ich herzlich für die gute Laune im Labor und für die Zeit, die sie mir zum Pipettieren gelassen haben.

Lebenslauf

Ulrich Eckhardt

September 1985 - Juli
1986:

Landwirtschaftliches Praktikum in Frankreich

Oktober 1986 - März 1987: Studium der Biologie an der J.W.Goethe-Uni, Frankfurt/M.

April 1987 - August 1994

Studium der Biochemie, FU Berlin, Diplomarbeit: "Isolierung und Charakterisierung eines Saccharosetransporter cDNA-Klons aus Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L.) sowie Untersuchungen zur Expression heterologer Membranproteine in Pflanzenzellen" unter Anleitung von Prof. Dr. L. Willmitzer

seit März 1995:

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin.
Anfertigung der Promotionsarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. T.J. Buckhout.

Eigene Publikationen

Eckhardt U. und Buckhout T.J. (1998): Iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* involves ferric reduction and is similar to Strategy I higher plants *J. Exp. Bot.* **49**, 1219-1224.

Eckhardt U. und Buckhout T.J. (2000): Analysis of the mechanism of iron assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*: A model system for Strategy I plants. *J. Plant Nutr.* **23**(11), im Druck.

Eckhardt U., Mas Marques A. und Buckhout T.J. (2000): Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol. Biol.* im Druck.

Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich keinerlei Hilfsmittel, außer den oben angegebenen, zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet habe

Berlin den 20.12.2000

(Ulrich Eckhardt)